

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**MODULAÇÃO DAS FUNÇÕES DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO PELO
RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT_{1A} DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL NO COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE RATOS.**

CLADIS LOREN KIEFER MORAES

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Florianópolis, SC

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**MODULAÇÃO DAS FUNÇÕES DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO PELO
RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT_{1A} DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL NO COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE RATOS.**

CLADIS LOREN KIEFER MORAES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis - SC
2008

O tempo não é algo que se possa olhar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma,

Ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez pela orientação, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por ter contribuído com meu crescimento científico favorecendo minha formação profissional.

Aos professores Dr. Jorge Alberto Quilfeldt, Rui Daniel Schröder, Dra. Cilene Lino de Oliveira, Ricardo Luiz Nunes de Souza, Dr. Leandro José Bertoglio pelas importantes contribuições que enriqueceram este trabalho.

Ao meu esposo Fernando e ao meu filho Felipe por me acolher com tanto carinho e pelo incentivo, amor e compreensão a mim dedicado, quando subtraí horas de nosso convívio familiar na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de laboratório que permitiram compartilhar bons momentos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários do biotério pela eficiência e simpatia no atendimento.

Aos colegas de outros laboratórios, Felipe, Marcelo, Ana, Alexandre, pela troca de idéias científicas sempre tão construtivas.

À amiga Luciane que sempre soube quando como estar próxima em todos os momentos, pelo apoio, incentivo e momentos divertidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ) e a Fundação d Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Comportamento defensivo	2
1.2 Modelos para estudo do comportamento defensivo.....	5
1.2.1 Labirinto em cruz elevado	5
1.2.2 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma	6
1.3 Substrato neuroanatômico do comportamento defensivo	8
1.4 Substância cinzenta periaquedutal e comportamento defensivo.....	9
1.5 Participação dos receptores NMDA na modulação do comportamento defensivo.....	11
1.6 Participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} na modulação do comportamento defensivo.....	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais	21
3.2 Drogas e Soluções	21
3.3 Cirurgia Estereotáxica	22
3.4 Cânulas e agulhas injetoras	23

3.5 Microinjeção intracerebral	23
3.6 Modelos experimentais	25
3.6.1 Labirinto em cruz elevado	25
3.6.2. Esquiva Inibitória do tipo descida da plataforma.....	27
3.7 Procedimentos e protocolos experimentais.....	28
3.7.1 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd sobre o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao LCE.....	28
3.7.2 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} da SCPd sobre o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao LCE.....	29
3.7.3. Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} sobre a atividade glutamatérgica da SCPd sobre o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao LCE	29
3.7.4 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.	31
3.7.5 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} da SCPd de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	32
3.7.6 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} sobre a atividade glutamatérgica da SCPd submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.	33
3.8 Perfusão e histologia.....	35
3.9. Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Localização dos sítios de injeção	39
4.2 Interação entre neurotransmissão glutamatérgica e serotoninérgica na SCP dorsal em ratos testados no LCE.	40
4.2.1 Efeito da infusão de NMDA na SCPd em ratos submetidos ao teste no LCE.....	40

4.2.2 Efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd em ratos submetidos ao teste no LCE	42
4.2.3 Efeito da infusão de DPAT e de WAY sobre a atividade glutamatérgica da SCPd em ratos submetidos ao teste no LCE.	44
4.3 Interação entre neurotransmissão glutamatérgica e serotoninérgica na SCP dorsal em ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.	48
4.3.1 Efeito da infusão de NMDA na SCPd de ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.	48
4.3.2 Efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd de ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.	50
4.3.3 Efeito da infusão de DPAT e de WAY sobre a atividade glutamatérgica da SCPd em ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.....	52
5 DISCUSSÃO.....	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7 APÊNDICE	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE- aminoácido excitatório
ANOVA - Análise de variância
AR- Avaliação de risco
EBA - Entrada nos braços abertos
EBF- Entrada nos braços fechados
EPM- Erro padrão da média
DLH – D,L-ácido homocisteínico
LCE- Labirinto em cruz elevado
NMDA- N-Metil-D-aspartato
SCD- Sistema cerebral de defesa
SCD – Substância cinzenta periaquedutal
SCPd- Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCA – Sistema cerebral aversivo
SIC – Sistema de inibição comportamental
TBA- Tempo nos braços abertos
SNC- Sistema nervoso central.
5-HT – 5-hidroxitriptamina
5-CT – 5 carboxamidotriptamina
8-OH-DPAT- ([8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin]
WAY-100135- ((s)-N-thert-butil-3-(2-methoxifenil) piperazina-1-yl)
 fenilpropanamida
BAY R1531- 6-methoxi-4-(di-n-propilamina)-1,3,4,5-tetrahidrobenz(c,d)indole
 hidroclorido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do aparato labirinto em cruz elevado.....	23
Figura 2	Fotografia da caixa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	25
Figura 3	Protocolo experimental do teste no LCE.....	27
Figura 4	Protocolo experimental do modelo da esquiva inibitória.....	31
Figura 5	A) Fotomicrografia representando o sítio de injeção da SCPd. B) Desenhos modificados a partir do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson.....	34
Figura 6	Efeito da infusão pre-teste de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol na SCPd sobre os parâmetros do LCE.....	36
Figura 7	Efeito da infusão pre-teste de 8-OH-DPAT nas doses de 2 e 8 nmol e de WAY nas doses de 2 e 5 nmol na SCPd sobre os parâmetros do LCE.....	38
Figura 8	Efeito da infusão pre-teste de Veículo/NMDA 100 pmol, 8-OH-DPAT 2nmol/NMDA 100 pmol e 8-OH-DPAT 8 nml/NMDA 100 pmol na SCPd sobre os parâmetros do LCE.....	41
Figura 9	Efeito da infusão pre-teste de Veículo/NMDA 25 pmol, WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd sobre os parâmetros do LCE.....	42
Figura 10	Efeito da infusão de NMDA (25 e 100 pmol) na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	44
Figura 11	Efeito da infusão de 8-OH-DPAT (2 e 8 nmol) e B) efeito da infusão de WAY (2 e 5 nmol) na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	46
Figura 12	Efeito da infusão de veiculo/NMDA (25 e 100 pmol), 8-OH-DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol e 8-OH-DPAT 8 nmol/NMDA 100 pml na SCPd,	

	antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	49
Figura 13	Efeito da infusão de veículo/NMDA (25 e 100 pmol), 8-OH-DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol e 8-OH-DPAT 8 nmol/NMDA 100 pml na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	50
Figura 14	Efeito da infusão de veículo/NMDA 25 pmol, WAY (2 e 5 nmol), WAY 2nmol/NMDA25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da injeção pré-teste de Veículo/NMDA (25 e 100 pmol) na SCP dorsal de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	Apêndice
Tabela 2	Efeito da injeção pré-teste de 8-OH-DPAT (2 e 8 nmol)/veículo e WAY 100135 (2 e 5nmol)/Veículo na SCP dorsal de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	Apêndice
Tabela 3	Efeito da injeção pré-teste de veículo/NMDA 100, 8-OH-DPAT 2 e 5 nmol, DPAT 2/NMDA100 e 8-OH-DPAT8/NMDA100 na SCP dorsal de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	Apêndice
Tabela 4	Efeito da injeção pré-teste de veículo/NMDA 25, WAY(2 e 5 nmol), WAY 2/NMDA25 e WAY5/NMDA 25 na SCP dorsal de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE.....	Apêndice
Tabela 5	Efeito da injeção de NMDA (25 e 100 pmol) na SCP dorsal, antes do treino, de ratos submetidos à tarefa da apêndice esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	Apêndice
Tabela 6	Efeito da injeção de 8-OH-DPAT (2 e 8 nmol) e WAY (2 e 5 nmol) na SCP dorsal, antes do treino, de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	Apêndice
Tabela 7	Efeito da injeção pré-treino de NMDA (25 e 100 pmol), 8-OH-DPAT8/Veículo, 8-OH-DPAT8/NMDA25 e 8-OH-DPAT8/NMDA100 na SCP dorsal, antes do treino de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	Apêndice
Tabela 8	Efeito da injeção pós-treino de NMDA 25 e 8-OH-DPAT8/NMDA25 na SCP dorsal, imediatamente após o treino de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da	Apêndice

	plataforma.....	
Tabela 9	Efeito da injeção de Veiculo/NMDA 25, WAY (2 e 5 nmol), WAY2/NMDA25 e WAY5/NMDA25 na SCP dorsal, antes do treino de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.....	Apêndice

RESUMO

Vários estudos têm caracterizado o envolvimento da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) nas respostas defensivas exibidas por roedores diante de estímulos aversivos, como a exposição a ambientes com espaços abertos, quando submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), ou na presença de um choque elétrico. Vários neurotransmissores, como glutamato e serotonina, modulam o comportamento defensivo relacionado à ansiedade na SCP dorsal. Dados na literatura mostram que ambos os receptores para glutamato subtipo n-metil-d-aspartato (NMDA) e para serotonina do subtipo 5-HT_{1A} da SCP dorsal interferem nas respostas sutis como a esquiva inibitória, entretanto, uma possível interação entre estes receptores necessita ser melhor investigada. Com base nestes aspectos, o objetivo do presente estudo foi investigar se a ativação ou o bloqueio do receptor 5-HT_{1A} da SCP dorsal pode interagir funcionalmente com o receptor NMDA em animais expostos à tarefa do LCE e à esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. A infusão de NMDA 25 pmol foi avaliada em ratos pré-tratados com o antagonista do receptor 5-HT_{1A} WAY100135 (2 e 5 nmol). Além disso, o efeito do NMDA 100 pmol foi avaliado em ratos pré-tratados com o agonista do receptor 5-HT_{1A} (2 e 8 nmol). Os resultados mostraram que a infusão de NMDA 25 pmol na SCP dorsal aumentou o comportamento de esquiva inibitória no LCE. O efeito do tipo ansiogênico foi suprimido pelo pré-tratamento com WAY100135 na dose de 5 nmol. Embora a dose de 100 pmol tenha falhado em aumentar a resposta de esquiva no LCE, quando comparado ao grupo controle, o pré-tratamento com o agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, nas doses de 8 nmol, fez com que a dose de NMDA 100 pmol produzisse um efeito do tipo ansiogênico. Da mesma forma, o pré-tratamento com 8-OH-DPAT reverteu o prejuízo da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma, causado pela infusão de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol quando injetado na SCP dorsal antes do treino, enquanto o pré-tratamento com 8-OH-DPAT após o treino não foi capaz de reverter o prejuízo da esquiva causado pelo NMDA 25 pmol. Estes resultados sugerem uma interação entre os receptores 5-HT_{1A} e NMDA da SCP dorsal na modulação do comportamento defensivo.

ABSTRACT

Several studies have been defined the dorsal periaqueductal gray (dPAG) matter as the responsible for the defensive responses by the rodents in aversive stimulation, as the exposition in opening spaces as the elevated plus maze (EPM) or in a presence of an electrical shock. Several neurotransmitters as glutamate and serotonin, modulate the defensive behavior that are related to the anxiety in the dPAG. Data in the literature have been shown that receptors for glutamate sub-type *N*-methyl-*D*-aspartic acid and for serotonin, sub-type 5-HT_{1A} from dPAG interfere with subtle responses such as inhibitory avoidance, but a possible interaction between this neurotransmitter system in these responses remains to be better investigated. Based on these aspects, the objective of this work was to investigate whether the agonist and antagonist of the 5-HT_{1A} receptor located in the dPAG would interact with NMDA function in animals exposed to the elevated EPM task and training and test of step-down one trial inhibitory avoidance task (SIDA). The effect of NMDA 25 pmol was evaluated in rats pretreated with the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100135 (2 and 5 nmol). Besides this, the effects of NMDA 100 pmol were evaluated in rats pretreated with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (2 and 8 nmol). The results had shown that the infusion of NMDA 25 pmol in the dPAG increased the inhibitory avoidance behavior in the LCE. The anxiogenic-like effect of the NMDA was counteracted by the pretreatment with WAY100135 (5 nmol). Although 100 pmol of NMDA failed to increase inhibitory avoidance to control group, in rats pretreated with 8-OH-DPAT (2 and 8 nmol) this NMDA dose produces an anxiogenic-like effect. In the same way, the pretreatment with 8-OH-DPAT (2 and 8 nmol) before the training in avoidance inhibitory task had reverted the impairment induced by NMDA (25 and 100 pmol) injected in the dPAG in rats submitted to the inhibitory avoidance task, but, the pretreatment with 8-OH-DPAT (8 nmol), after the training, wasn't able to attenuate the impairment caused by NMDA 25 pmol. These results suggest an interaction between the 5-HT_{1A} receptors and NMDA of dPAG in the defensive behavior modulation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento defensivo

As emoções possuem grande valor adaptativo para o indivíduo e estão associadas a diferentes funções de sobrevivência – proteção contra o perigo, alimentação, reprodução, cuidados com a prole – cada uma delas provavelmente requer diferentes sistemas cerebrais. A emoção envolve a expressão de sentimentos que podem ser agradáveis ou desagradáveis; manifestações comportamentais, isto é, respostas motoras que podem ser estereotipadas e, desta forma, de natureza reflexa ou involuntária; e manifestações fisiológicas endócrinas e autonômicas (LENT, 2004). No que diz respeito ao medo e à ansiedade, e de acordo com a perspectiva evolutiva, tais sensações são manifestações emocionais decisivas relacionadas a diferentes estratégias de defesa empreendidas pelos em resposta a situações de perigo e ameaça que podem comprometer a sua sobrevivência (GRAEFF e GUIMARÃES, 2001). O medo difere da ansiedade na medida em que é uma resposta a uma ameaça conhecida, externa, definida, enquanto ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo induzido pela expectativa de perigo. A ansiedade é uma resposta habitual, com caráter importante e necessário no que diz respeito à advertência de perigos que podem ameaçar a integridade física. No entanto, quando muito intensa a ansiedade pode interferir na capacidade de concentração e desempenho de tarefas intelectuais (GRAEFF e GUIMARÃES, 2001). Emoções como medo e ansiedade apresentam

correlatos comportamentais mais claros entre animais e seres humanos possibilitando desta forma o estudo de sua base neurobiológica (LENT, 2004). Embora as espécies tenham suas próprias formas de reagir ao perigo, a similaridade dos padrões de resposta é a regra. Na verdade, não são as formas de expressão do medo, mas sim os diferentes estímulos que ativam o sistema de defesa que diferenciam as reações de medo em seres humanos e em outros animais. Cada animal é capaz de detectar as situações de perigo específicas para ele, mas o uso das estratégias de reação – fuga, imobilidade, agressão, submissão e os ajustes fisiológicos – é comum a todas as espécies.

Embora emoções como medo e ansiedade façam parte do comportamento de defesa, este também pode ser resultante de condições ambientais. Por exemplo, um animal que se defronta com um predador foge se for possível, caso contrário adota uma postura de ameaça. Porém, se o predador não se intimida, passa a atacá-lo. Neste sentido, estudos realizados por Blanchard e Blanchard (1989, 1990) utilizando ratos selvagens, mostraram que as estratégias de defesa exibidas pelos animais variam com o tipo de ameaça. Estes pesquisadores caracterizaram três níveis de defesa contra predadores. O primeiro nível ocorre em resposta a um perigo potencial, onde o animal desempenha uma exploração cautelosa (*risk assessment*), andando com o corpo estirado e o ventre rente ao solo, caracterizando respostas defensivas sutis. Respostas defensivas evidentes ocorrem a partir do segundo nível frente a um perigo distal, quando o predador está ausente, porém encontra-se a certa distância. Nesta situação, o animal adota uma postura de imobilidade tensa (congelamento), preparando-se para a luta ou fuga. Finalmente, o terceiro nível se dá quando o predador está muito próximo ou já estabeleceu contato com a presa. Esta situação faz com que o rato fuja

rapidamente ou, quando a fuga é impossível, ataque violentamente o predador. Essas manifestações comportamentais estão associadas a ajustes fisiológicos que dão suporte ao desempenho das reações de defesa.

Um aspecto relevante a ser comentado diz respeito à influência do aprendizado na expressão do medo/ansiedade. Estímulos discretos ou contextos ambientais originalmente neutros passam a evocar o medo quando estão associados a estímulos aversivos. Por exemplo, se um rato levou choque elétrico nas patas quando se encontrava no interior de uma caixa experimental, apresentará imobilidade tensa, quando recolocado no mesmo ambiente. Evolutivamente, o aprendizado das respostas defensivas frente a estímulos previamente condicionados e que remetem à ameaça é essencial para a sobrevivência das espécies e pode ser considerado um componente do sistema comportamental defensivo de mamíferos (FANSELOW, 1994).

As emoções como medo e ansiedade são ajustadas fisiologicamente e têm como função preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. Entretanto, quando o medo e a ansiedade são mais constantes e persistentes eles interferem nas atividades da vida normal, resultando em grande sofrimento. Nestes casos a resposta defensiva deixa de ser útil, tornando-se um distúrbio de ansiedade (LEDOUX, 1998, KORTE e DE BÖER, 2003). Assim, o estudo e a compreensão do comportamento emocional no homem dependem, em grande parte, do estudo do comportamento em animais. Logo, a importância dos modelos animais fica evidente para uma melhor compreensão das bases neurais do comportamento defensivo, bem como para a descoberta de novas abordagens terapêuticas (BRANDÃO, 2002).

1.2 Modelos para estudo do comportamento defensivo

1.2.1 Labirinto em cruz elevado

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados para estudar o comportamento de defesa, os diferentes sistemas de neurotransmissão e as diferentes estruturas neurais envolvidas neste comportamento (GRIEBEL, 1995; TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Um modelo utilizado para avaliar o comportamento defensivo é o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O LCE é um dos mais populares modelos de ansiedade e fundamenta-se no repertório natural de defesa do rato. Este modelo deriva do trabalho de Montgomery (1955) e reflete a relação entre a motivação exploratória dos ratos em ambientes novos e potencialmente aversivos e o comportamento de esquiva, desta forma criando um claro conflito entre aproximação/esquiva (RODGERS e COLE, 1994; para revisão ver RODGERS e DAVIS, 1997). O LCE consiste de dois braços abertos opostos a dois braços fechados, elevados do chão. A resposta de esquiva aos braços abertos é concordante com a idéia de que estas áreas evocam reação de medo maior que a provocada pelos braços fechados. Assim, as proporções das atividades (frequência de entradas e tempo) nos braços abertos do LCE são tidas como índices tradicionais de ansiedade (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELOW et al., 1985). Neste contexto, animais tratados com drogas ansiolíticas aumentam significativamente a atividade exploratória aos braços abertos, e os tratados com drogas ansiogênicas

diminuem a exploração relativa aos braços abertos (PELLOW et al., 1985, GRAEFF e GUIMARÃES, 2001)

Estudos recentes indicam que a sensibilidade do modelo pode ser ainda incrementada adotando-se uma abordagem mais detalhada, que inclua a análise de parâmetros etológicos (posturas defensivas, reações de congelamento, comportamento de avaliação de risco e esquiva) ou também a análise minuto a minuto do perfil comportamental do animal durante a exposição ao LCE (RODGERS et al., 1996, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002).

O LCE, por ser um modelo que se fundamenta no repertório natural de defesa do rato frente a um estímulo desconhecido, cria um conflito entre explorar um ambiente novo e aversivo e a esquiva a este ambiente, e se caracteriza por uma resposta defensiva menos intensa. Assim sendo, o estudo do comportamento de esquiva aos braços abertos é uma ferramenta útil para avaliar a participação de estruturas neurais e sistemas de neurotransmissão neste comportamento.

1.2.2 Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma

O comportamento defensivo descrito anteriormente compreende reações defensivas frente a estímulos ameaçadores. Um conjunto elaborado de respostas é necessário, e a capacidade de detecção, elaboração e coordenação de estratégias defensivas determina o comportamento defensivo. Diferentes tipos de estímulos podem acionar o sistema de defesa. Os estímulos ameaçadores podem desencadear reações de defesa sem necessidade de aprendizagem. No entanto, quando tais estímulos adquirem

propriedades aversivas por terem sido associados, anteriormente, a estímulos nocivos, o ambiente passa a sinalizar um caráter aversivo e as respostas desencadeadas são influenciadas pelo aprendizado (GOLD, 1986). Assim sendo, estímulos ameaçadores como, choque nas patas, exposição ao predador e odor de gato também podem ser condicionados ao contexto e a pistas associativas e assim evocar um comportamento defensivo (BLANCHARD E BLANCHARD, 1969, FANSELOW, 1980). Porém, é a capacidade de reagir adequadamente às ameaças que garante a sobrevivência dos indivíduos e dos animais.

Dentre os modelos experimentais usados para se estudar aprendizagem e memória emocional, o teste da esquia inibitória do tipo descida da plataforma tem sido muito usado para estudar o efeito de drogas na aprendizagem e na memória, a partir de manipulações farmacológicas antes e após o treino e antes do teste com o objetivo de avaliar a aquisição, consolidação e evocação do aprendizado de memórias aversivas (GOLD, 1986). Neste teste, a aprendizagem aversiva é adquirida imediatamente após o animal ser colocado e descer de uma plataforma para uma grade em uma caixa e, pareado com um único choque elétrico emitido nas patas, sendo em seguida removido deste contexto. A medida da retenção da memória é avaliada 24 horas após, através da re-exposição do animal ao contexto do condicionamento, pela atenção de descida da plataforma (IZQUIERDO et al., 1992; IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Neste protocolo experimental, a sessão treino requer que o animal associe o contexto com o choque, sendo que estes dois componentes foram apresentados durante uma única sessão.

1.3 Substrato neuroanatômico do comportamento defensivo

Os estudos conduzidos para investigar as bases neurobiológicas do medo e da ansiedade têm-se valido de técnicas como a estimulação elétrica, lesão ou injeção de drogas em estruturas encefálicas para o mapeamento das estruturas envolvidas na gênese e controle destes comportamentos defensivos. No entanto, o substrato neural para esses comportamentos ainda não está totalmente esclarecido. Baseado em um conjunto de evidências experimentais, Graeff (1981) propôs a existência de um sistema cerebral aversivo (SCA), envolvido com a expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas, atuando quando a fonte de ameaça está muito próxima. Este sistema teria como substrato neural o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), ao qual mais tarde foi proposta a incorporação do colículo superior e inferior e passou a ser identificado como sistema encefálico aversivo (SEA; BRANDÃO, 1999). Além do SEA, Gray, em 1982, propôs o envolvimento do sistema septo-hipocampal (SSH) na mediação do comportamento defensivo, como principal substrato neural do sistema de inibição comportamental (SIC), responsável pelo controle da supressão do comportamento, com aumento da vigilância e da avaliação de risco. Em 2000, Gray e McNaughton, baseados em novos conhecimentos que surgiram após a publicação da teoria de 1982, reformularam alguns conceitos e integraram o construto do SIC com o do SCA, ressaltando que os substratos neurais desses dois sistemas atuam de modo complementar na realização de respostas defensivas.

1.4 Substância cinzenta periaquedutal e comportamento defensivo

Quanto aos seus aspectos anatômicos, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto de Sylvius. É subdividida anatômica e funcionalmente em quatro colunas neuronais longitudinais ao longo do seu eixo rostro-caudal. Estas colunas são denominadas de: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral, devido às suas posições em relação ao aqueduto (BANDLER e DEPAULIS, 1991). Por ser inervada por uma abundante rede de vias aferentes e eferentes, a SCP é considerada uma estrutura cerebral complexa (MANTHY, 1982a; 1982b; BEITZ e SHEPARD, 1985). A profusa inervação da SCP estaria de acordo com a sua participação na integração de muitas funções importantes para a sobrevivência do organismo, tais como: processamento e modulação da informação dolorosa, controle motor e cardiovascular e respostas defensivas (BEITZ, 1990, 1995; BEHBEHANI, 1995).

A literatura mostra evidências de que a estimulação da SCP é capaz de produzir uma analgesia tão profunda em ratos que uma laparotomia poderia ser realizada sem o uso de anestésicos (REYNOLDS, 1969). Além disso, a estimulação da SCP dorsal em humanos, além de produzir analgesia, promovia em pacientes cirúrgicos sensações intoleráveis de medo intenso, de pavor e de morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas como: piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço (NASHOLD et al., 1969). Muito importante também foram os estudos com estimulação elétrica e química da SCP dorsal em animais de laboratório, que evocam comportamentos defensivos. As respostas obtidas são do tipo

luta ou fuga, e são acompanhadas de uma complexa série de mudanças cardiovasculares e motoras (BANDLER e CARRIVE, 1988; KRIEGER e GRAEFF, 1985). Contudo, para melhor avaliar as funções defensivas mediadas pela SCP foram realizados estudos utilizando a estimulação química através do uso de aminoácidos excitatórios (DE OCA, 1998; BRANDÃO, et al., 1999; TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999; CARVALHO-NETO et al., 2006). A participação da SCP no medo e na ansiedade tem sido bem caracterizada dado o efeito da administração de benzodiazepínicos nessa estrutura neural, que desencadeia um efeito ansiolítico (GRAEFF et al., 1993; MENARD e TREIT, 1999). Em concordância com estes achados, outros estudos utilizando lesão da SCP mostraram que as reações defensivas observadas pela estimulação do hipotálamo ou da amígdala foram abolidas ou eliminadas. Essas pesquisas sugerem, que a SCP seria uma via comum para respostas defensivas, cuja integridade parece ser essencial para a coordenação da reatividade defensiva do animal (BANDLER, 1988; GRAEFF et al., 1988). Ao longo dos anos, vários estudos comportamentais têm mostrado que a SCP é uma estrutura crítica na seleção, organização e no comando das reações defensivas comportamentais e neurovegetativas (BANDLER, 1988; FANSELOW, 1991; BRANDÃO et al., 1999; CAROBREZ et al., 2001).

Embora o papel da SCP nos mecanismos associados com o medo e a ansiedade esteja bem caracterizado, a literatura também mostra seu envolvimento em aspectos relacionados ao aprendizado de respostas emocionais condicionadas (DI SCALA et al., 1987; DE OCA et al., 1998; WALKER e CARRIVE, 2003). De acordo com Fanselow (1991), a amígdala canaliza a chegada do estímulo do meio e então sinaliza para a SCP o grau de ameaça que ele representa para o organismo, e este, por sua vez, seleciona, organiza e executa reações defensivas neurovegetativas e comportamentais

apropriadas. Os experimentos desenvolvidos por Canteras e colaboradores demonstraram que o núcleo pré-mamilar do hipotálamo, que é uma estrutura crítica para mediar respostas defensivas desencadeadas pela presa diante de situações de ameaça, envia densas projeções neurais para a SCP dorsolateral (CANTERAS E SWANSON, 1992; CANTERAS et al. 2001). Estudos mais recentes desenvolvidos por Canteras e colaboradores (2008) demonstraram que no estímulo condicionado há uma ativação do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) sugerindo que esta via poderia se projetar para a SCP sinalizando o grau de ameaça. Desta forma a ativação da SCP não se daria diretamente pela amígdala, mas sim via PMd (CANTERAS et al., 2008). Desta forma, a SCP parece estar envolvida com a dinâmica do processo associativo durante o condicionamento e, para tal, pode estar interagindo com estruturas mais rostrais no cérebro, modificando o processamento das informações (VIANA E BRANDÃO et al., 2003; MILLAN, 2003; MARTINEZ et al., 2006).

1.5 Participação dos receptores NMDA na modulação do comportamento defensivo

De acordo com o exposto acima, a SCP tem um papel fundamental na geração e mediação de comportamentos defensivos, evidenciados inicialmente por estimulação elétrica e posteriormente por estimulação química. Vários sistemas de neurotransmissão têm sido associados com a mediação do comportamento defensivo pela SCP entre os quais os aminoácidos excitatórios (AAE). O glutamato é o principal

neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (COLLINGRIDGE e LESTER, 1989) e exerce suas ações em receptores específicos, classificados como ionotrópicos, ligados a um canal iônico, e metabotrópicos, ligados à proteína G (HOLLMAN e HEINEMANN, 1994). Os receptores ionotrópicos subdividem-se em três subgrupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propionic, (AMPA) e cainato, classificados de acordo com suas propriedades agonísticas (LEESON e IVERSEN, 1994).

O sistema glutamatérgico, em especial os receptores NMDA, tem sido alvo de muitos estudos, estando envolvido em uma série de funções no sistema nervoso central (SNC), tais como: memória, aprendizado, desenvolvimento neuronal e plasticidade sináptica (MORRIS e DAVIS, 1984; BLISS e COLLINGRIDGE, 1993; LUJÁN et al., 2005); excitotoxicidade neuronal decorrente de isquemia e hipoglicemia (MCCULLOCH, 1992); epilepsia e outras doenças neurodegenerativas (MELDRUM, 1985, 2000); dependência e tolerância química (ROSSETTI e CARBONI, 1995); dor neuropática (EISENBERG et al., 1998) e os transtornos emocionais, como a ansiedade e depressão (para revisão ver CAROBREZ, 2003; BERGINK et al., 2004).

Nos últimos anos, pesquisas comportamentais destacam o envolvimento do receptor NMDA na mediação do comportamento defensivo. Injeções sistêmicas de antagonistas competitivos ou não-competitivos têm mostrado efeitos do tipo ansiolítico em diversos modelos animais de ansiedade (STEPHENS et al., 1986; BENNETT E AMRICK, 1987; TRULLAS et al., 1989; KEHNE et al., 1991; BLANCHARD et al., 1992, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003).

De modo complementar, estudos revelam que os receptores NMDA estão presentes de forma expressiva na coluna dorsolateral da SCP em toda a sua extensão

rostrocaudal (ALBIN et al., 1990; BEITZ, 1995). Assim a microinjeção de agonistas NMDA na SCP dorsal evocam respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de defesa e estes efeitos podem ser bloqueados seletivamente por antagonistas dos aminoácidos excitatórios (CAROBREZ, 1987; GRAEFF et al., 1988). Trabalhos posteriores revelaram um perfil ansiolítico de antagonistas de receptores NMDA, quando injetados na SCP dorsal (DUNN et al., 1989; GUIMARÃES et al., 1991; TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999; CAROBREZ et al., 2001; MOLCHANOV e GUIMARÃES, 2002), de ratos avaliados em diferentes modelos animais de ansiedade.

1.6 Participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} na modulação do comportamento defensivo

Estudos na literatura têm sido conduzidos demonstrando que a serotonina (5-HT) pode ser considerada um neurotransmissor importante envolvido na modulação de comportamentos fisiológicos como apetite, memória, humor, regulação da temperatura corporal, processamento sensorial e atividade motora, comportamento sexual e emocional, incluindo medo, ansiedade e agressão (GRIEBEL, 1995). A diversidade dessas funções pode estar relacionada à sua interação com vários outros sistemas de neurotransmissão, uma vez que o sistema serotoninérgico central que se origina no mesencéfalo, nos núcleos da rafe, é amplamente distribuído para várias regiões cerebrais (AZTMIA e SEGAL, 1978; para revisão ver MILLAN, 2003).

A 5-HT exerce suas funções através de vários tipos de receptores. Até o momento, vários tipos e subtipos de receptores foram caracterizados. No entanto, a sua função fisiológica não tem sido totalmente relacionada. Dos vários receptores caracterizados (5-HT_{1A,B,C,D,E,F}; 5-HT_{2A,B,C}; 5-HT_{3A,B,C}; 5-HT₄, 5-HT_{5A,B}; 5-HT₆; 5-HT₇) a maioria deles pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇), enquanto que um número menor faz parte da família dos receptores acoplados a canais iônicos (5-HT₃) (MOULIGNIER, 1994).

Os receptores 5-HT_{1A} compreendem várias subclasses (MOULIGNIER, 1994), são caracterizados por sua alta afinidade pela 5-HT e estão entre os de maior interesse na pesquisa científica, dada a sua participação na modulação do comportamento emocional, como no medo e na ansiedade (DEAKIN e GRAEFF, 1991; HANDLEY, 1995), além de integrar funções complexas como a cognição (MENESES, 1999; MENESES, 2007). Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados tanto pré-sinápticamente (auto-receptores somatodendríticos) sobre neurônios nos núcleos da rafe quanto pós-sinápticamente em estruturas límbicas, entre as quais amígdala, hipocampo e SCP. A ativação de receptores pré-sinápticos resulta em inibição da atividade neuronal e conseqüente diminuição na neurotransmissão de 5-HT, assim como a ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos levam a uma inibição neuronal em áreas cerebrais como hipocampo, septo e SCP, por estarem acoplados à proteína G inibitória (GRIEBEL, 1995; GRAEFF, 2002).

De acordo com a literatura, o interesse no estudo do receptor 5-HT_{1A} intensificou-se com o potencial terapêutico de drogas que atuam neste receptor no tratamento de transtornos da ansiedade, com a introdução na prática clínica da buspirona, um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} (EISON e TEMPLE, 1989) com propriedade

ansiolítica semelhante aos benzodiazepínicos, assim como, dos inibidores da recaptação da serotonina pela sua ação antidepressiva (ARGYROPOULUS et al., 2000).

Em termos de experimentação animal, pesquisas comportamentais sobre a reação defensiva envolvendo o receptor 5-HT_{1A} na SCP dorsal têm mostrado que o comportamento de fuga induzido pela estimulação química com o aminoácido excitatório D,L-ácido homocistéico (DLH) tem sido atenuado pela injeção prévia dos agonista 5-HT_{1A}, 8-hidroxi-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) e 5 carboxamidotryptamina (5-CT), sugestivo de efeito antiaversivo (BECKETT et al., 1992 a; BECKETT e MARDSEN, 1997). Corroborando essa proposição, Nogueira e Graeff (1995) mostraram que a injeção intra-SCP dorsal do agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (DPAT) e BAY R 1531, aumentou o limiar aversivo produzido pela estimulação elétrica da SCP dorsal, caracterizando um efeito antiaversivo. Um modelo muito utilizado para estudar o efeito de drogas intra-SCP dorsal, o labirinto em T elevado, possibilita avaliar dois tipos de resposta, a fuga e a esquiva inibitória (GRAEFF et al., 1993). Neste modelo, Zanovelli e colaboradores (2003) mostraram que o uso de agonista do receptor 5-HT_{1A} na SCP dorsal levou a um prejuízo na resposta de fuga ao mesmo tempo em que inibiu a esquiva inibitória. Para melhor entender essas respostas Deakin e Graeff (1991) sugerem que a fuga seria controlada pela SCP dorsal e que a esquiva estaria sob o controle da amígdala. Assim, Deakin e Graeff (1991) sugerem que este papel dual da 5-HT na SCP dorsal teria a finalidade de integrar diferentes tipos de reações de defesa. Por vezes, responder com a fuga (via de ativação da SCP dorsal) pode ser inapropriado em situações nas quais o perigo é apenas discreto e potencial. Neste caso, estratégias mais flexíveis e elaboradas, como a esquiva comportamental,

coordenada pela amígdala, podem ser mais eficazes (GRAEFF, 2002). Diante do acima exposto, de acordo com a teoria de Deakin e Graeff (1991) neurônios 5-HT exercem uma modulação bidirecional sobre a resposta coordenada pela SCP dorsal, ou seja, uma diminuição na liberação de 5-HT na SCP favorece a expressão da resposta de fuga, enquanto um aumento de 5-HT na SCP dorsal inibe a fuga (para revisão ver BRANDÃO et al., 1999; LOVICK et al., 2000; GRIEBEL et al., 2000; ZANGROSSI et al., 2001; DE PAULA E SOARES e ZANGROSSI, 2004; POBE e ZANGROSSI, 2005). Por outro lado, De Paula e Soares e Zangrossi (2004) mostram a ausência de efeito pelo uso do antagonista 5-HT_{1A} intra-SCPd, sugerindo que a ativação do receptor 5-HT_{1A}, mas não a inativação, pode interferir no desempenho de uma tarefa específica (labirinto em T elevado). Outros estudos, ainda utilizando modelos experimentais de condicionamento, mostram o envolvimento da 5-HT na SCP dorsal inibindo respostas defensivas observadas no contexto, como congelamento (MARTINEZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Como a 5-HT tem papel fundamental na regulação de muitas funções fisiológicas, as pesquisas têm demonstrado que a participação do receptor 5-HT_{1A} nas respostas defensivas induzidas quimicamente na SCP dorsal, pode ser do tipo modulatória (BECKETT et al., 1992; NOGUEIRA e GRAEFF, 1995; BECKETT e MARSDEN, 1995; 1997).

Um aspecto importante a ser destacado considerando o efeito modulatório da 5-HT é a sua interação com outros sistemas de neurotransmissão como adrenérgico (AUDI et al., 1989), glutamatérgico (LICATA et al., 1998; EDAGAWA et al., 1999; MAURA et al., 2000; MAJID, 2006), e gabaérgico (LISTA et al., 1990; GRIFFITHS e LOVICK, 2002; ROBINSON et al., 2003), descrito na literatura.

Estudos têm demonstrado que a ativação do receptor 5-HT_{1A} através do agonista 8-OH-DPAT pode diminuir a aversão gerada na SCP dorsal por estimulação elétrica (NOGUEIRA e GRAEFF, 1995) bem como diminuir o comportamento de fuga avaliado em uma arena circular, induzido por microinjeção do aminoácido D,L-homocistéico (DLH) na SCP (BECKETT et al., 1992; BECKETT e MARSDEN, 1995). Nesses modelos, a estratégia defensiva exibida pela estimulação elétrica ou pelo aminoácido é bem evidente e caracterizada por comportamento de fuga. No entanto, não há relatos na literatura sobre a modulação serotoninérgica mediada pela ativação da SCP dorsal no comportamento de esquiva aos braços abertos no modelo do LCE e ao choque nas patas no modelo da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Assim, tendo em vista as considerações mencionadas anteriormente sugerindo o envolvimento da SCP dorsal na mediação do comportamento defensivo através do sistema glutamatérgico e serotoninérgico, bem como as evidências implicando o envolvimento modulatório do sistema serotoninérgico na mediação das respostas comportamentais de defesa através de sua interação com o sistema glutamatérgico, o presente estudo propôs investigar as seguintes hipóteses:

1. O envolvimento dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA da SCP dorsal na mediação da resposta defensiva de esquiva.
2. O papel modulatório dos receptores 5-HT_{1A} da SCP dorsal sobre os receptores glutamatérgicos tipo NMDA na mediação da resposta defensiva de esquiva.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Para testar as hipóteses propostas, o presente estudo definiu como objetivo geral investigar o efeito da infusão de 8-OH-DPAT e WAY 100135 como agonista e antagonista do receptor 5-HT_{1A} respectivamente, na SCP dorsal sobre a atividade excitatória decorrente da ativação do receptor de glutamato subtipo NMDA na mediação do comportamento de esquiva. Para alcançar o objetivo geral proposto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA da SCP dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste no LCE e à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.
2. Avaliar a participação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{1A} da SCP dorsal sobre o comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste no LCE e à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.
3. Avaliar a interação entre os receptores NMDA do sistema glutamatérgico e os receptores 5-HT_{1A} do sistema serotoninérgico da SCP dorsal no comportamento defensivo de ratos submetidos ao teste no LCE e à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações Éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências, e que foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (278/CEUA e 23080.006118/2004-36/UFSC). Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos, com 3-4 meses de idade, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), em duplas ou trios. Durante todo o período de permanência no biotério, os animais tiveram livre acesso à água e ração, e foram mantidos em ambiente com temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo de luz (12 h claro/escuro) controlados, iniciando o claro às 7 h.

3.2 Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados, as seguintes drogas foram utilizadas: xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil), quetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribbrands, Brasil), Xilocaína 2% (2-dietil-N—[2,6-dietifenil]-acetamida HCl, RBI, EUA), (()-8-hidroxi-2-dipropilaminotetralin HBr (DPAT; RBI, USA); (S)-WAY 100135 diidroclorido (TOCRIS, USA), N-Metil-D-Asparto (NMDA, Sigma, USA); Giemsa (Sigma-Aldrich), DPX (Fluka),

CitriSolv TM (Fisher brand) e Azul de Evans (Sigma, EUA). PBS (tampão fosfato-salina) foi utilizado como veículo para dissolver as drogas e como solução controle. Para dissolver WAY 100135 foi utilizado PBS e Tween 80 a 2%, veículo (PBS com tween 80 2%).

3.3 Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com uma injeção IP (intraperitoneal) de 1,5 ml/kg de uma solução combinada (2:3) de xilazina e quetamina. Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se a tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então uma solução de xilocaína com adrenalina (2 %), por via subcutânea, com objetivo de obter efeito anestésico local e vasoconstritor. Em seguida, realizou-se uma incisão longitudinal no escalpo para a exposição da calota craniana permitindo a visualização da sutura lambdóide. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia de 13 mm. Os dois parafusos foram colocados logo atrás do bregma.

Para o implante da cânula, as medidas foram aferidas e a elas adicionadas as coordenadas obtidas do Atlas do encéfalo de ratos de Paxinos e Watson (1998) referentes às porções caudal da SCPd (anteroposterior (AP)= -7,6 mm, em relação ao Bregma, médio-lateral (ML) = +1,9 mm e dorso-ventral (DV) = -2 mm a partir da superfície externa do osso craniano) em um ângulo de 22 °. Na cânula foi adaptado um

mandril n° 30, com o intuito de prevenir o seu entupimento.

Após adaptar os parafusos, a cânula e o mandril, o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico autopolimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma prótese sólida. Decorridos alguns minutos para a secagem total desta, o animal pôde ser retirado do aparelho estereotáxico. Após a cirurgia os animais foram mantidos em uma sala com o aquecedor ligado a uma temperatura de 25° a 27°C para evitar a hipotermia conseqüente da anestesia geral. Posteriormente, os animais retornaram ao biotério nas caixas moradias (2-3 ratos por gaiola), com livre acesso à água e comida, onde permaneceram por no mínimo sete dias em recuperação até a data do experimento.

3.4 Cânulas e agulhas injetoras

As cânulas-guia implantadas a fim de possibilitar as microinjeções na SCPd foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. As agulhas foram cortadas com o auxílio do paquímetro (Mitutoyo – Brasil), as cânulas foram ajustadas para 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permite a sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.5 Microinjeção intracerebral

As drogas administradas foram NMDA, um agonista do receptor NMDA, dissolvido em tampão fosfato (PBS; pH 7.4), cuja solução também serviu como controle; 8-OH-DPAT (DPAT), um agonista do receptor 5-HT_{1A}, que foi dissolvido em tampão fosfato; WAY, antagonista do receptor 5-HT_{1A}, que foi dissolvido em tween 80 a 2% cuja

solução também serviu de solução controle. As doses das drogas e o volume de infusão foram escolhidos com base em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, em experimentos piloto e de estudos anteriores (SENA et al., 2003). Uma semana após a cirurgia, os animais receberam infusões de PBS, NMDA nas doses de 25 e 100 pmol, DPAT nas doses de 2 e 8 nmol e WAY nas doses de 2 e 5 nmol na SCP dorsal. A infusão foi efetuada por meio de agulha injetora (0,3 mm de diâmetro) confeccionada a partir de agulhas odontológicas, que excediam as medidas de comprimento da cânula-guia em 2 mm. Previamente ao procedimento de infusão, o tubo de polietileno (PE 10; Clay Adams, USA) e a microseringa Hamilton foram preenchidos com água destilada e, uma bolha, formada através da aspiração de ar, ficou entre água destilada e a droga. Dessa forma, durante a infusão, o movimento da bolha que era visível através do tubo de polietileno indicou o fluxo da droga administrada. Para a microinjeção, o animal foi imobilizado manualmente e foi retirado o mandril adaptado à cânula-guia durante o ato cirúrgico. A cânula foi limpa com uma lima odontológica, cortada de maneira a não ultrapassar 13 mm de comprimento. Posteriormente, a agulha foi introduzida pela cânula e com o auxílio de uma bomba de infusão (0,5 µl/ 50s; modelo BI 2000, Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi injetado em cada animal um volume de 0,3 µl de solução, através de uma taxa de infusão de 0,60 µl / min, em 30 s. Após a infusão, a agulha injetora permaneceu no local por mais um minuto, para facilitar a difusão da solução.

3.6 Modelos experimentais

Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase diurna do ciclo claro/escuro entre 09:00 e 12:00 horas. Ao término de cada sessão experimental, o animal foi retirado e o modelo experimental foi limpo com uma solução de etanol a 10%.

3.6.1 Labirinto em cruz elevado

Esse equipamento, em forma de cruz (Figura 1), elevado 50 cm do chão, é composto por dois braços fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm) opostos a dois braços abertos (50 x 10 cm), sendo que tais braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico, com 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais. A área de junção dos quatro braços, chamada de plataforma central, mede 10 X 10 cm. O modelo estava localizado numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 44 lux.

No teste do LCE, os ratos foram submetidos a uma sessão experimental denominada de teste, durante 5 min. O teste comportamental foi registrado por uma câmara de vídeo acoplado a um gravador de fitas VHS instalado em uma sala adjacente, para posterior leitura do comportamento. Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução de etanol 10%.

Os parâmetros comportamentais avaliados no LCE foram:

- Frequência de entradas dos animais com as 4 patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto.
- Tempo de permanência dos animais com as 4 patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto.

Estas medidas tradicionais foram usadas para se calcular a porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos quatro braços (%EBA) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.

- Avaliação de risco (AR), representado no LCE pela frequência de tentativas de entradas nos braços abertos, sendo consideradas tentativas o comportamento de estiramento do corpo a partir dos braços fechados ou da plataforma central, com a colocação da cabeça e pelo menos uma, duas ou três patas em um dos braços abertos, com posterior retração à posição original. Este comportamento é realizado a partir dos braços fechados ou da plataforma central em direção aos braços abertos.
- Frequência de entradas nos braços fechados (EBF), medida que representa atividade exploratória geral.



Figura 1. Fotografia do aparato labirinto em cruz elevado

3.6.2. Esquiva Inibitória do tipo descida da plataforma

O modelo da esquiva inibitória foi realizado em uma caixa de acrílico (30 x 20 x 20 cm; Figura 2), com uma plataforma (20 X 8 X 1,5 cm) situada no lado direito da caixa e com um piso gradeado de aço inoxidável (barras gradeadas separadas 1 cm uma da outra) no assoalho conectado a um sistema gerador de choques (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil), que permitiu a emissão de choques elétricos com intensidade e tempo definidos em 0,5 mA em 2 s. Este teste compreendeu uma sessão treino, na qual um choque elétrico foi liberado imediatamente após o rato descer espontaneamente da plataforma para o piso, com as quatro patas, sendo retirado logo em seguida da caixa. No dia seguinte foi realizada a sessão teste, com duração máxima de 180 segundos, na qual foi medido o tempo de permanência do animal sobre a plataforma. Assim, as latências de descida da plataforma no treino e no teste, serviram como índice de retenção de memória, e foram registradas pelo experimentador presente na sala do teste. Durante o teste, a latência máxima de descida da plataforma foi de 180 segundos. As sessões experimentais foram realizadas em um ambiente com intensidade luminosa de 90 lux.

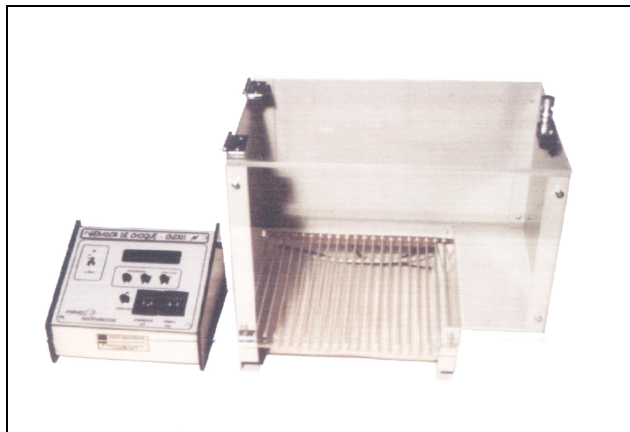


Figura 2. Fotografia da caixa de esquia inibitória do tipo descida da plataforma

3.7 Procedimentos e protocolos experimentais

3.7.1 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd sobre o comportamento de esquia de ratos submetidos ao LCE

Neste experimento, os ratos foram submetidos ao teste no LCE após a microinjeção na SCPd de NMDA, nas doses de 25 e 100 pmol, seguindo o protocolo esquematizado na figura 3, formando os seguintes grupos experimentais descritos abaixo. O grupo controle aqui definido foi utilizado em todos os demais grupos, mesmo que no desenho experimental eles apareçam repetidamente. Todos os animais receberam duas injeções porque o protocolo geral previa um pré-tratamento. O desenho experimental serve de orientação para delineamento dos grupos, mas não representa a seqüência de desenvolvimento experimental. As doses de NMDA foram baseadas em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, uma vez que nos interessava a dose de NMDA que no LCE demonstrasse efeito ansiogênico ou não.

Grupo 1: PBS - PBS

Grupo 2: PBS – NMDA 25 pmol

Grupo 3: PBS – NMDA 100 pmol

3.7.2 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} da SCPd sobre o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao LCE

Neste experimento os ratos foram submetidos ao teste no LCE após a microinjeção na SCPd de DPAT e WAY, seguindo o protocolo esquematizado na figura 3, formando os seguintes grupos experimentais descritos abaixo. As doses de DPAT e WAY foram baseadas em estudos da literatura (SENA et al., 2003).

Grupo 1: Veículo - Veículo

Grupo 2: DPAT 2 nmol – Veículo

Grupo 3: DPAT 8 nmol – Veículo

Grupo 4: WAY 2 nmol – Veículo

Grupo 5: WAY 5nmol – Veículo

3.7.3. Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} sobre a atividade glutamatérgica da SCPd sobre o comportamento de esquiva de ratos submetidos ao LCE

Para avaliar inicialmente o efeito dos receptores 5-HT_{1A} através da injeção do agonista DPAT sobre a atividade dos receptores NMDA os ratos foram submetidos ao teste do LCE após a microinjeção da droga, seguindo o protocolo da figura 3, formando

os seguintes grupos experimentais.

Grupo 1: Veículo – Veículo

Grupo 2: Veículo - NMDA 100 pmol

Grupo 3: DPAT 2 nmol – NMDA 100 pmol

Grupo 4: DPAT 8 nmol – NMDA 100 pmol

Da mesma forma para avaliar o efeito dos receptores 5-HT_{1A} através da injeção do antagonista WAY sobre a atividade dos receptores NMDA, os ratos foram submetidos ao teste do LCE após a microinjeção da droga, seguindo o protocolo da figura 3, formando os seguintes grupos experimentais.

Grupo 1: Veículo – Veículo

Grupo 2: Veículo – NMDA 25 pmol

Grupo 2: WAY 2 nmol – NMDA 25 pmol

Grupo 3: WAY 5 nmol – NMDA 25 pmol

Para efeitos de comparação foram utilizados os dados do grupo PBS – NMDA 25 pmol e PBS – NMDA 100 pmol, (descritos como Veículo – NMDA) pois o controle PBS e veículos foram agrupados por não apresentarem diferença estatisticamente significantes ($F(1,28)= 0,5468$ $p= 0,50177$).

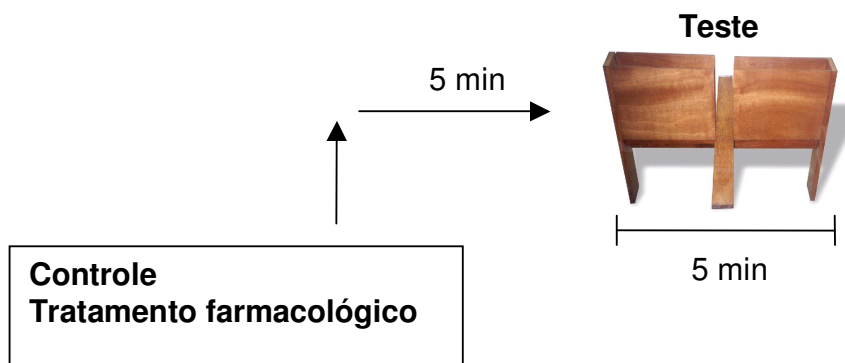


Figura 3. Protocolo experimental do teste no LCE.

Para a execução desses experimentos, os ratos foram retirados do biotério do laboratório, levados para uma sala onde permaneceram por 1 hora. Após esse tempo, cada rato foi individualmente colocado em uma caixa e conduzido à outra sala. Nesta sala, o rato permaneceu por aproximadamente 10 minutos e foi tratado conforme protocolo mencionado acima. Cada animal recebeu duas microinjeções com um intervalo de 5 minutos. Desta forma, 5 minutos após a última microinjeção, cada rato foi transferido para a sala de teste, sendo retirado da caixa e colocado na plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi registrado durante 5 minutos.

3.7.4 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da SCPd de ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliar a participação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA da SCPd na

aquisição da esquiva no modelo da esquiva inibitória, os ratos receberam a infusão de NMDA, um agonista glutamatérgico nas doses de 25 e 100 pmol, antes do treino. Como o NMDA nas duas doses prejudicou a aquisição, a dose de 25 pmol foi selecionada e microinjetada também imediatamente após o treino, para verificar a participação do receptor NMDA da SCPd no processo da consolidação do medo adquirido no modelo da esquiva inibitória, seguindo o protocolo esquematizado na figura 4, formando os seguintes grupos experimentais descritos abaixo.

Grupo 1: PBS – PBS

Grupo 2: PBS – NMDA 25 pmol

Grupo 3: PBS – NMDA 100 pmol

Grupo 4: PBS – NMDA 25 imediatamente após o treino

3.7.5 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} da SCPd de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliar a participação do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} da SCPd na aquisição do medo aprendido no modelo da esquiva inibitória, os ratos receberam a infusão de DPAT e WAY antes do treino, seguindo o protocolo esquematizado na figura 4, formando os seguintes grupos experimentais descritos abaixo.

Grupo 1: Veículo - Veículo

Grupo 2: DPAT 2 nmol – PBS

Grupo 3: DPAT 8 nmol – PBS

Grupo 4: WAY 2 nmol – Veículo

Grupo 5: WAY 5nmol – Veículo

3.7.6 Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} sobre a atividade glutamatérgica da SCPd submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliar o efeito dos receptores 5-HT_{1A} através da injeção do agonista DPAT sobre a atividade dos receptores NMDA os ratos foram submetidos ao treino após a microinjeção da droga, seguindo o protocolo esquematizado na figura 4, formando os seguintes grupos experimentais.

Grupo 1: Veículo – Veículo

Grupo 2: Veículo – NMDA 100 pmol

Grupo 3: DPAT 2 nmol – NMDA 100 pmol

Grupo 4: DPAT 8 nmol – NMDA 100 pmol

Para efeito de comparação foram utilizados os dados do grupo PBS – NMDA 25 pmol e PBS – NMDA 100 pmol, (descritos como Veículo – NMDA), pois o controle PBS e veículos foram agrupados por não apresentarem diferença estatisticamente significantes ($F(1,7) = 3,5607$ $p = 0,7636$).

Para avaliar o efeito do receptor 5-HT_{1A} através da injeção do agonista DPAT sobre a atividade dos receptores NMDA, os ratos foram microinjetados após o treino,

segundo o protocolo esquematizado na figura 4, formando os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1: Veículo - Veículo

Grupo 2: NMDA 25 pmol - Veículo

Grupo 3: DPAT 8 nmol– NMDA 25 pmol

Da mesma forma para avaliar o efeito dos receptores 5-HT_{1A} através da injeção do antagonista WAY sobre a atividade dos receptores NMDA, os ratos foram submetidos ao treino após a microinjeção da droga, seguindo o protocolo da figura 4, formando os seguintes grupos experimentais.

Grupo 1: Veículo – Veículo

Grupo 2: Veículo – NMDA 25 pmol

Grupo 3: WAY 2 nmol – NMDA 25 pmol

Grupo 4: WAY 5 nmol – NMDA 25 pmol

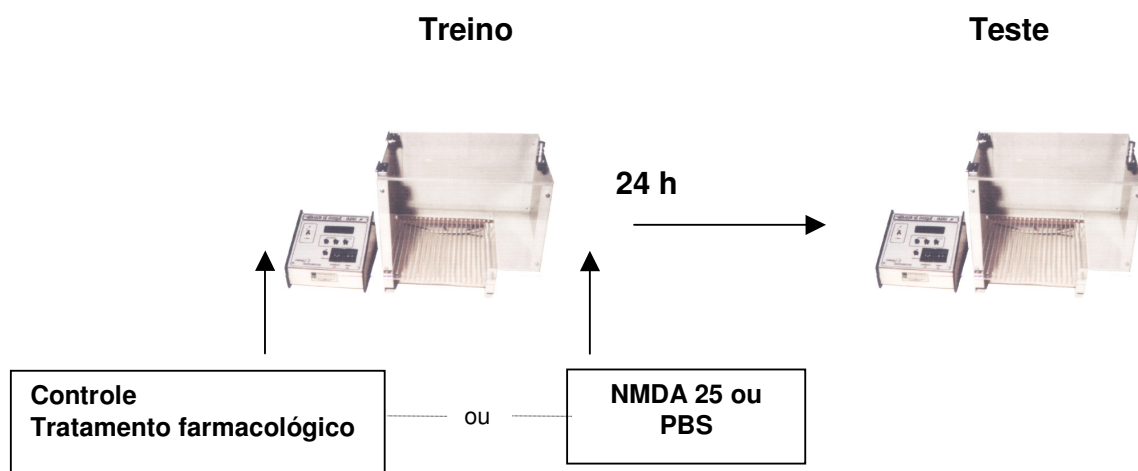


Figura 4: Protocolo experimental do modelo da esquia inibitória.

Os procedimentos relacionados com a retirada dos animais do biotério até o momento de infusão, cujos tratamentos estão citados acima, foram idênticos àqueles efetuados para o LCE. O rato foi conduzido para a sala do experimento e colocado sobre a plataforma do aparelho. A descida espontânea da plataforma, com as quatro patas no piso gradeado, foi seguida por um choque elétrico (2s, 0,5 mA) e a retirada imediata do animal. Na sessão teste, 24 horas após, a latência de descida da plataforma foi também registrada e nenhum choque foi aplicado.

3.8 Perfusão e histologia

Completados os procedimentos experimentais, os animais foram devidamente anestesiados com uma solução a 15% de hidrato de cloral (Vetec, Brasil), administrado

por via intraperitoneal (2 ml/Kg). Em seguida, receberam infusão do corante azul de Evans (0,5%; Sigma, USA), conforme realizado para infusão de NMDA, DPAT ou WAY ou Veículo na SCP dorsal. Depois disso, os animais foram perfundidos, via intracardiaca, com salina (0,9%) seguida por uma solução de formalina (10%). O encéfalo foi removido e pós-fixado na solução de formalina por 24 horas, sendo transferido para uma solução de sacarose (30%) e mantido sob refrigeração até sua secção. Os encéfalos foram cortados no plano transversal em um criostato (CM150; Leica, Germany) em secções de 60 µm de espessura e montados em lâminas de vidro, para identificação do local marcado com azul de Evans. Os cortes foram comparados com os diagramas obtidos do Atlas (PAXINOS E WATSON, 1998). Os dados obtidos a partir de animais com sítio de infusão fora da SCPd foram excluídos da análise estatística.

Para confecção das fotomicrografias, as lâminas, previamente montadas, permaneciam secando durante uma semana, para então serem coradas. Primeiro, as lâminas eram lavadas e hidratadas duas vezes durante 2 min em uma cuba contendo água destilada. Posteriormente, foram imersas em corante de Giemsa (Sigma-Aldrich) por 6 min e lavadas com água destilada. Em seguida, as lâminas foram passadas nos álcoois 70%, 90%, 100%, 100% durante 2 min em cada álcool, e, em seguida, foram colocadas em CitroSolv duas vezes de 5 min cada. Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com DPX (resina sintética). Em seguida, as lâminas coradas foram fotografadas em um microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagem (Olympus Co. modelo BX41, Melville, NY, EUA).

3.9. Análise estatística

Os parâmetros estudados no teste do LCE foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via através do programa estatístico: Statistica®-StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA. Neste caso, os tratamentos intra-SCPd foram considerados como variáveis independentes; os parâmetros comportamentais observados foram considerados como variáveis dependentes e a histologia positiva foi considerada como condição. Valores significativos do tratamento indicados pela ANOVA foram submetidos ao teste post hoc de Duncan, para múltiplas comparações e de Dunnett para comparação entre controle e tratamento.

Para análise estatística das latências de descida da plataforma na esQUIVA inibitória, foi considerado o valor obtido pela diferença entre a latência nas sessões de treino e teste (Δ latência = latência teste – latência treino). Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA de um fator (tratamento), seguido pelo teste post-hoc Duncan e representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As latências obtidas durante a sessão de treino foram representadas pelo intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante esta sessão. Em todos esses métodos estatísticos o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Localização dos sítios de injeção

Os resultados obtidos nos testes comportamentais foram analisados estatisticamente após visualização dos cortes histológicos, que confirmaram os locais de infusões dos tratamentos. A análise histológica mostrou que os locais de infusão ficaram concentrados principalmente na região dorsal da SCP representados na figura 5, que compreende as colunas dorso-medial e dorso-lateral descritas por Bandler e colaboradores (1996).

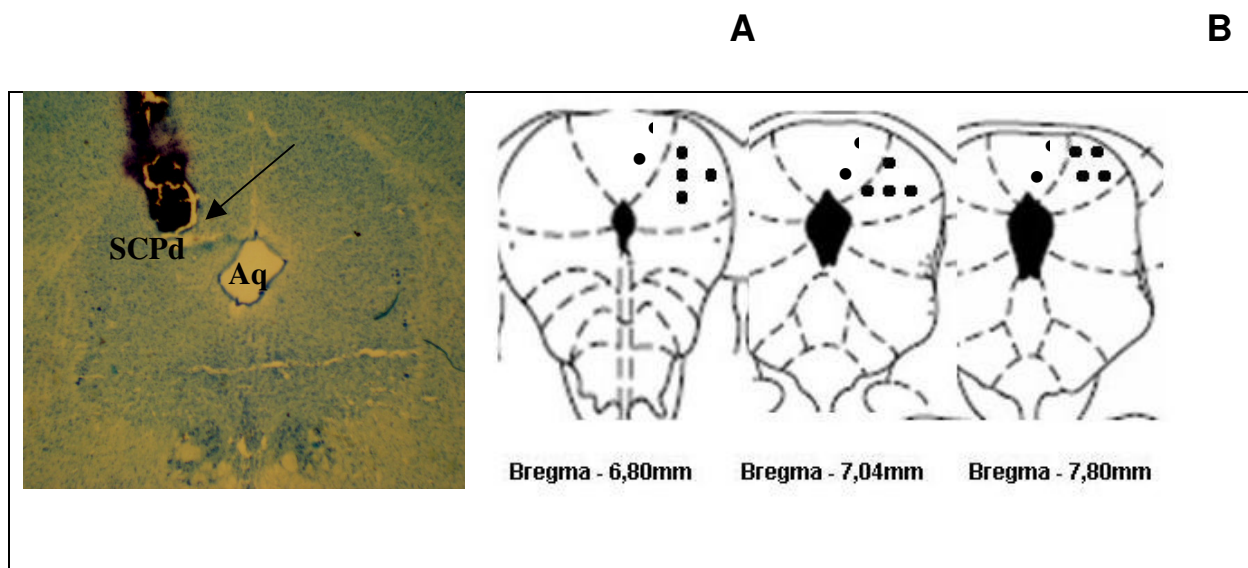


Fig.5 A): Fotomicrografia representando o sítio de injeção da SCPd. B) Diagramas coronais representando o local das microinjeções na SCPd (•). Somente uma parte dos locais de infusão está representada devido à sobreposição dos mesmos. Os valores em mm representam a distância em relação ao Bregma. Desenhos modificados a partir do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

4.2 Interação entre neurotransmissão glutamatérgica e serotoninérgica na SCP

dorsal em ratos testados no LCE.

4.2.1 Efeito da infusão de NMDA na SCPd em ratos submetidos ao teste no

LCE.

Para avaliação do efeito da infusão de NMDA na SCPd antes do teste, um total de 70 ratos foram utilizados.

Os resultados obtidos com a infusão de NMDA na SCPd antes do teste estão representados na Figura 6. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste, indicaram um efeito significativo do fator tratamento [% TA: $F(2,39) = 5,46$; $p=0,0080$; %EA: $F(2,39) = 4,57$; $p=0,0164$; EF: $F(2,39) = 6,40$; $p=0,0039$] para as medidas comportamentais %TA, %EA e EF durante o teste no LCE. O teste post-hoc revelou que a infusão de NMDA na dose de 25 pmol antes do teste no LCE provocou diminuição na %TA, %EA e EF durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi observado que a infusão de NMDA na dose de 100 pmol antes do teste no LCE provocou diminuição [EF ($F(2,39) = 6,40$, $p = 0,0076$)] na frequência de EF durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle. Com relação à frequência de EF observada após a infusão de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol, este tratamento possivelmente interferiu na atividade exploratória geral dos animais durante a sessão teste no LCE. Entretanto, esta diminuição na frequência de EF veio acompanhada de um aumento no parâmetro avaliação de risco, embora não tenha ocorrido diferença estatística em relação ao grupo controle [$(F(2,39)= 0,62208$ $p=$

0,54217]. Em contrapartida, o teste pos-hoc mostrou que apesar da infusão de NMDA na dose de 100 pmol provocar uma diminuição significativa na frequência de EF, conforme dados descritos anteriormente, esta mesma dose não alterou a atividade nos braços abertos (%TA e %EA).

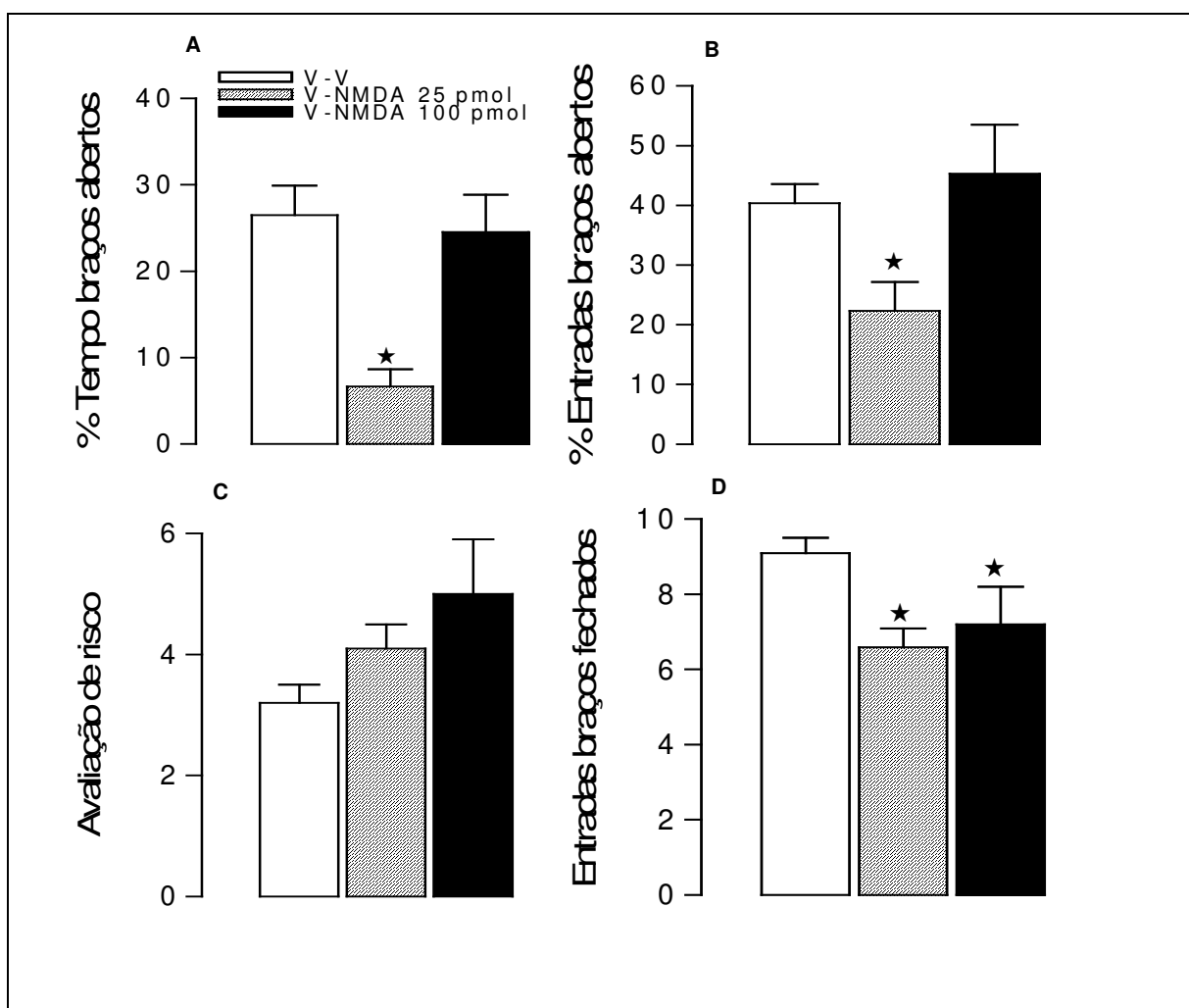


Figura 6. Efeito da infusão pré-teste de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco (C) e frequência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 9-13 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Dunnett * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.2 Efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd em ratos submetidos ao teste no LCE

Para avaliação do efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd antes do teste, um total de 160 ratos foram utilizados.

Os resultados obtidos com a infusão de DPAT e WAY na SCP dorsal, antes do teste, estão representados na Figura 7. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste indicou um efeito significativo do fator tratamento [AR: $F(2,39) = 3,8411$; $p=0,0300$] somente para a medida comportamental AR durante o teste no LCE. O teste post-hoc revelou que a infusão de DPAT na dose de 8 nmol antes do teste no LCE provocou um aumento na AR durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle. Estes efeitos não foram observados com a infusão de DPAT na dose de 2 nmol. Além disso, a infusão de DPAT não interferiu nos os parâmetros comportamentais %TA, %EA avaliados no teste, quando comparados com o controle. Com relação à frequência de EF, nenhum efeito foi observado nos grupos tratados com DPAT, quando comparados ao grupo controle, o que mostra que este tratamento não interferiu na atividade locomotora dos animais na sessão experimental. Em resumo, a infusão de DPAT, nas doses de 2 e 8 nmol antes do teste, não interferiu na atividade dos braços abertos do LCE ou na frequência de EF avaliados durante o teste no LCE.

Da mesma forma, a ANOVA dos resultados obtidos com a infusão de WAY na SCPd, antes do teste, não revelaram efeito significativo sobre as medidas comportamentais avaliadas no teste para o fator tratamento, quando comparados ao grupo controle. Em resumo, a infusão de WAY nas doses de 2 e 5 nmol antes do teste não interferiu no aspecto da esquiva durante o teste.

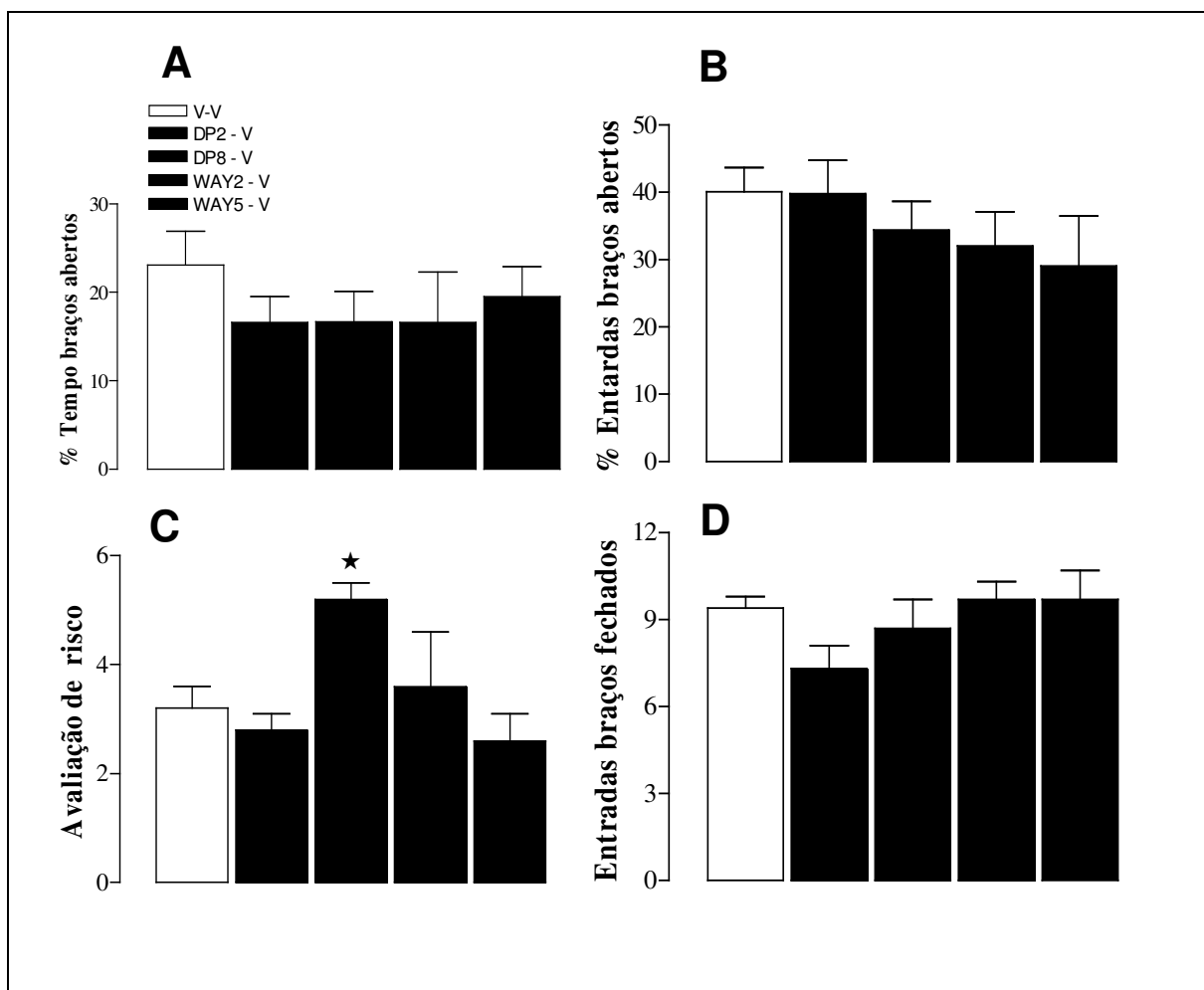


Figura 7. Efeito da infusão pré-teste de DPAT nas doses de 2 e 8 nmol e de WAY nas doses de 2 e 5 nmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, freqüência do comportamento de avaliação de risco (C) e freqüência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8 -13 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Dunnett * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.3 Efeito da infusão de DPAT e de WAY sobre a atividade glutamatérgica da SCPd em ratos submetidos ao teste no LCE.

Para avaliação do efeito da infusão do agonista e do antagonista do receptor 5-HT_{1A} sobre a atividade do receptor NMDA na SCPd antes do teste, um total de 170 ratos foram utilizados.

Os resultados obtidos com a infusão de DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd antes do teste estão representados na Figura 8. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste indicou um efeito significativo do fator tratamento [% TA: $F(3,52) = 4,44$; $p=0,0074$; EF: $F(3,52) = 6,56$; $p=0,00076$] para as medidas comportamentais %TA e EF durante o teste no LCE. O teste post-hoc revelou que a infusão de DPAT 2nmol/NMDA 100 pmol e a infusão de DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol antes do teste no LCE provocou diminuição na %TA durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle. Além disso, o teste post-hoc revelou que a infusão de DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol antes do teste no LCE não alterou a diminuição na frequência EF, quando comparados ao grupo controle. Ou seja, com relação ao parâmetro EF, os resultados obtidos com a infusão de DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol não modificaram os parâmetros da infusão de NMDA na dose de 100 pmol antes do teste no LCE .

A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste não revelou efeito significativo sobre as medidas comportamentais AR e % EA. Em resumo, a infusão de DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd, antes do teste, interferiu no comportamento de esquia aos braços abertos do LCE durante o teste.

Os resultados obtidos com a infusão de WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5

nmol/NMDA 25 pmol na SCPd, antes do teste, estão representados na Figura 9. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste indicou um efeito significativo do fator tratamento [% TA: $F(3,46) = 6,84$; $p=0,00066$; EF: $F(3,46) = 6,68$; $p=0,00077$ e % EA: $F(3,46) = 5,19$; $p=0,00353$] para as medidas comportamentais %TA, EF e %AE durante o teste no LCE. O teste post-hoc revelou que a infusão de Veículo/NMDA 25 pmol e a infusão de WAY 2nmol/NMDA 25 pmol, antes do teste no LCE, provocou diminuição na %TA durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle; ou seja, o pré-tratamento com WAY 2nmol/NMDA 25 pmol não modificou os resultados obtidos com a infusão de NMDA 25 pmol *per se*, descritos anteriormente. Além disso, o teste post-hoc revelou que a infusão de Veículo/NMDA 25 pmol, WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol antes do teste no LCE, provocou diminuição na frequência EF, quando comparados ao grupo controle. A análise post-hoc efetuada também revelou que a infusão de Veículo/NMDA 25 pmol e WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol antes do teste no LCE provocou diminuição na % EA durante esta sessão, quando comparados ao grupo controle. Com relação a este mesmo parâmetro (%EA), o teste post-hoc revelou que a infusão de WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol também não modificou os resultados obtidos com a infusão de NMDA 25 pmol *per se*, descritos anteriormente. A ANOVA dos resultados obtidos na sessão teste não revelou efeito significativo sobre as medidas comportamentais AR.

Em resumo, a infusão de WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol foi capaz de modificar o efeito da infusão de NMDA 25 pmol observado nos parâmetros % TA e % EA antes do teste. Desta forma, este tratamento interferiu com o comportamento de esquia aos braços abertos do LCE, observado durante o teste.

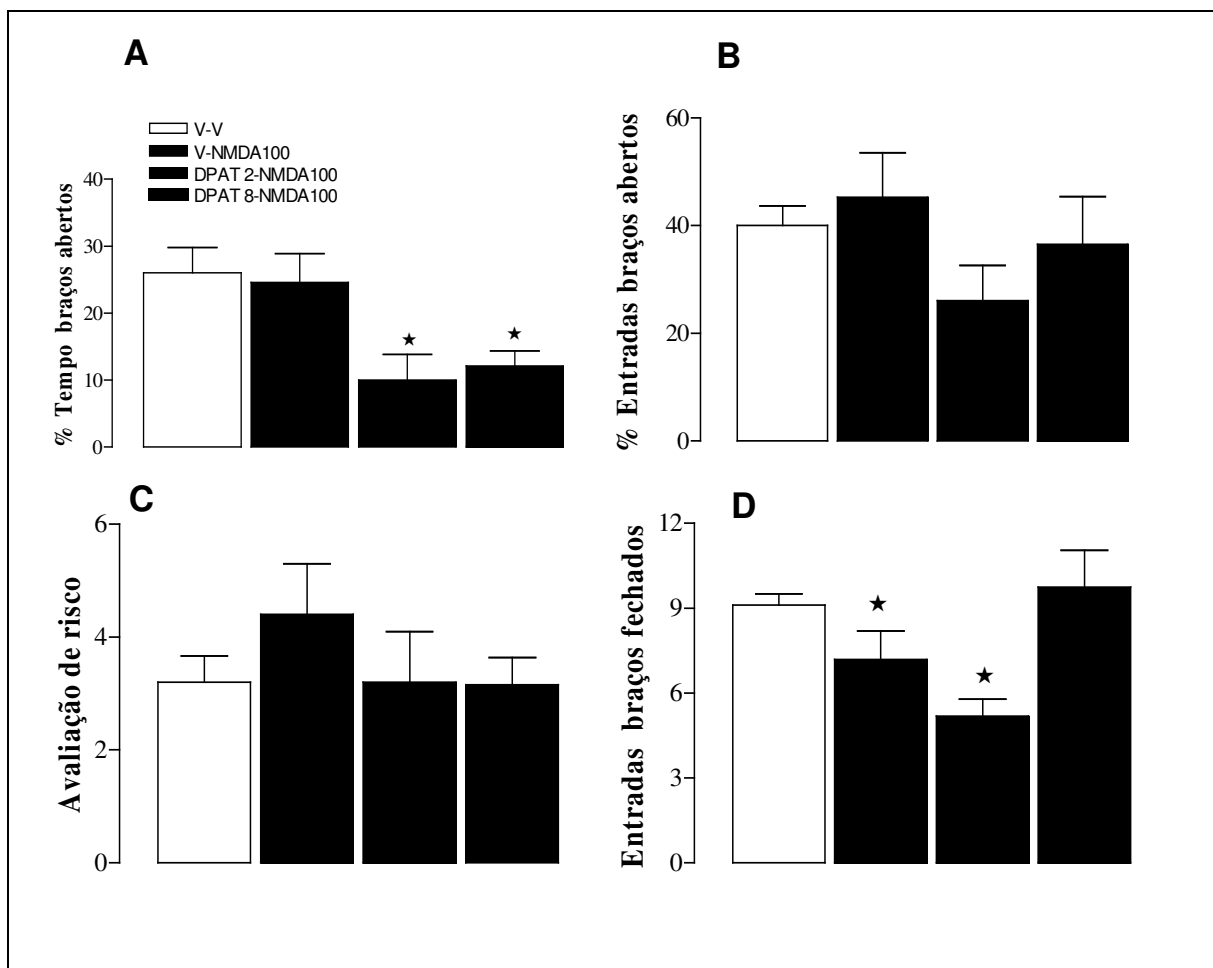


Figura 8. Efeito da infusão pré-teste de Veículo/NMDA 100 pmol, DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco (C) e frequência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n= 8 -13 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Duncan * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

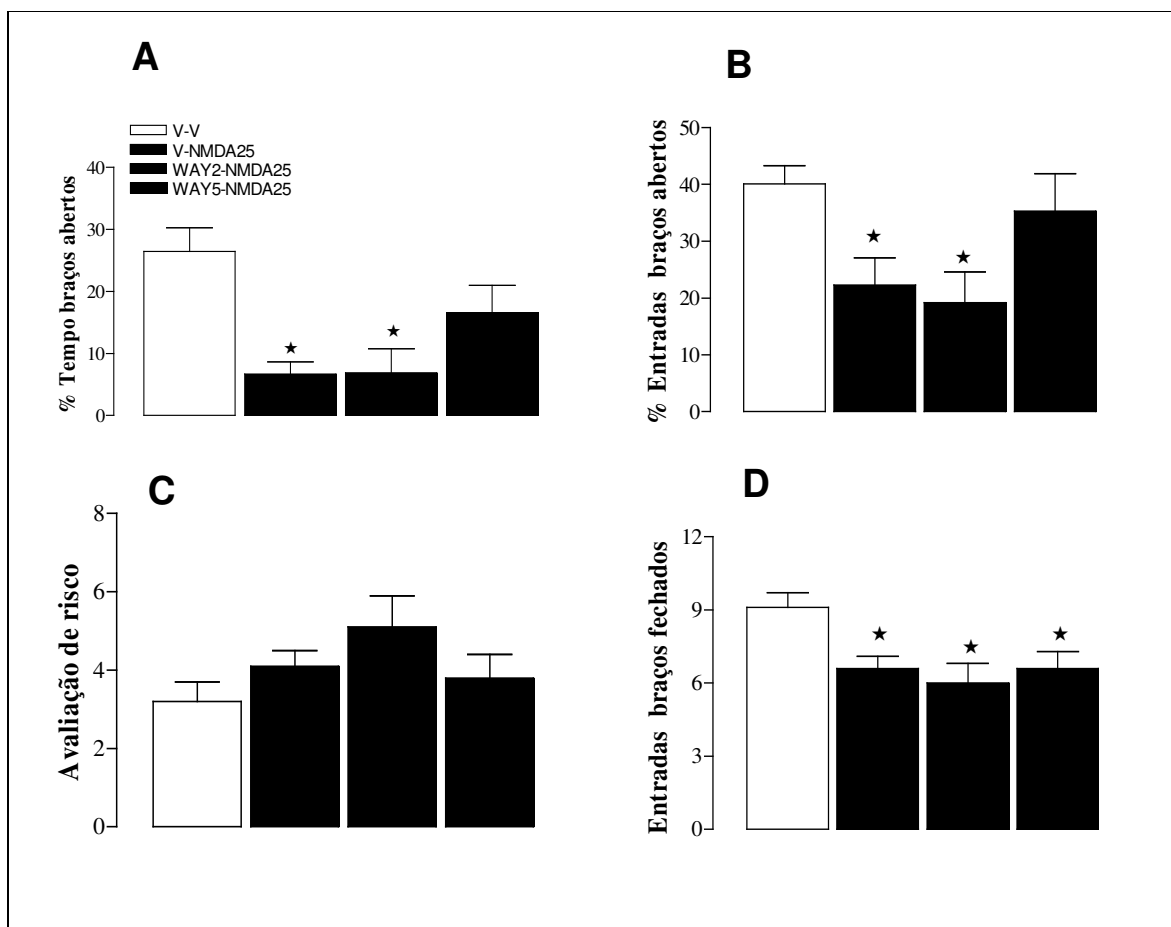


Figura 9. Efeito da infusão pré-teste de Veículo/NMDA 25 pmol, WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo (A) e % entradas (B) nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco (C) e frequência de entradas nos braços fechados (D) de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n=6 - 13 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Duncan * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.3 Interação entre neurotransmissão glutamatérgica e serotoninérgica na SCP dorsal em ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

4.3.1 Efeito da infusão de NMDA na SCPd de ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliação do efeito da infusão de NMDA na SCPd, antes e após o treino, na tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, com o intuito de verificar a participação da SCPd nas respostas emocionais aprendidas, um total de 100 ratos foram utilizados.

A figura 10 representa o efeito da infusão de NMDA (25 e 100 pmol) na SCPd antes do treino na aquisição da aprendizagem aversiva da tarefa da esQUIVA inibitória. A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam infusão de NMDA na dose de 25 e 100 pmol e o controle, antes do treino, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. A análise post-hoc revelou que a infusão de NMDA na dose de 25 pmol na SCPd, antes do treino, provocou uma redução na latência [$F(2,39) = 32,32$; $p = 0,00123$] de descida da plataforma durante a sessão teste, quando comparada com o controle. Da mesma forma, a análise post-hoc revelou que a infusão de NMDA na dose de 100 pmol na SCPd, antes do treino, também provocou uma redução [$F(2,39) = 32,32$; $p = 0,00118$] na latência de descida da plataforma durante a sessão teste, quando comparada com o controle. Estes resultados indicam que a infusão de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol interferiu com a aquisição do

aprendizado aversivo.

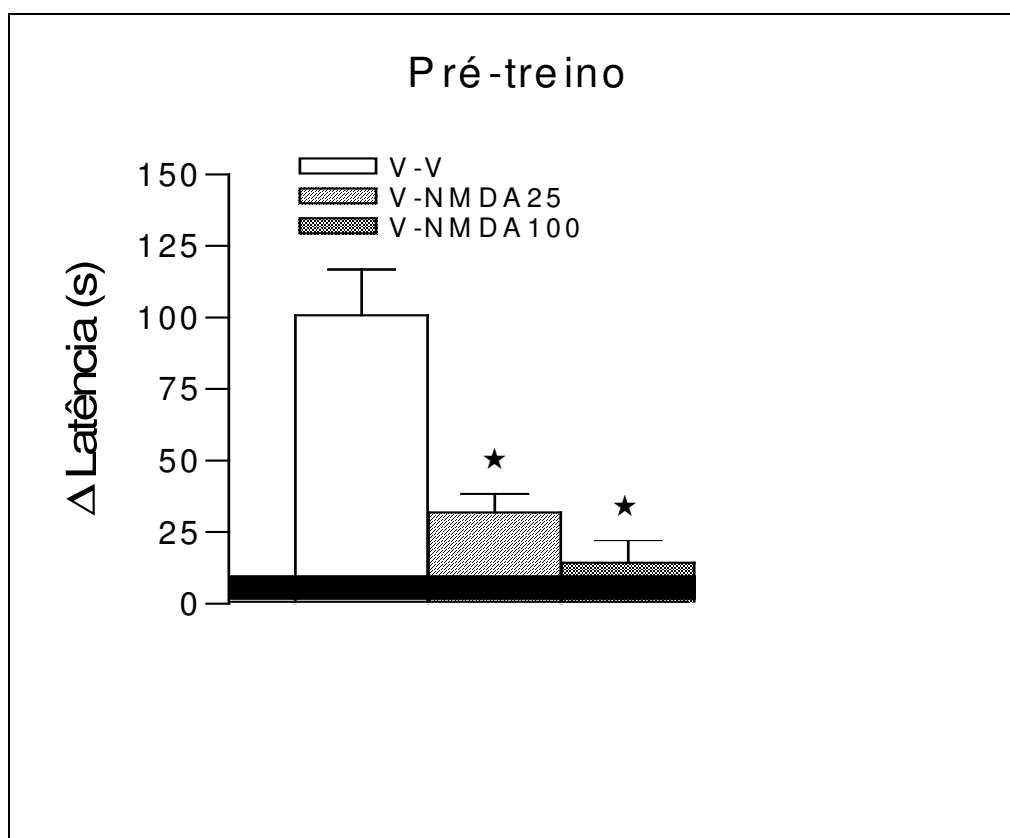


Figura 10. Efeito da infusão de NMDA (25 e 100 pmol) na SCPd antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiava inibitória (n= 11-15 por grupo). A barra hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem a média \pm EPM da diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Dunnett * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.3.2 Efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd de ratos submetidos à tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliação do efeito da infusão de DPAT e de WAY na SCPd, antes e após o treino, na tarefa da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma, um total de 190 ratos foram utilizados.

A Figura 11 representa o efeito da infusão de DPAT (2 e 8 nmol) e de WAY (2 e 5 nmol) na SCPd, antes do treino, sobre a aquisição da aprendizagem aversiva da tarefa da esquiva inibitória. A ANOVA não revelou um valor significativo entre os animais que receberam a infusão de DPAT (2 e 8 nmol) e o grupo controle nem entre os animais que receberam infusão de WAY (2 e 5 nmol) e o grupo controle, antes do treino, na latência de descida da plataforma avaliada na sessão teste. Em resumo, estes resultados mostram que a infusão de DPAT e WAY não afetou a aquisição aprendido aversivo.

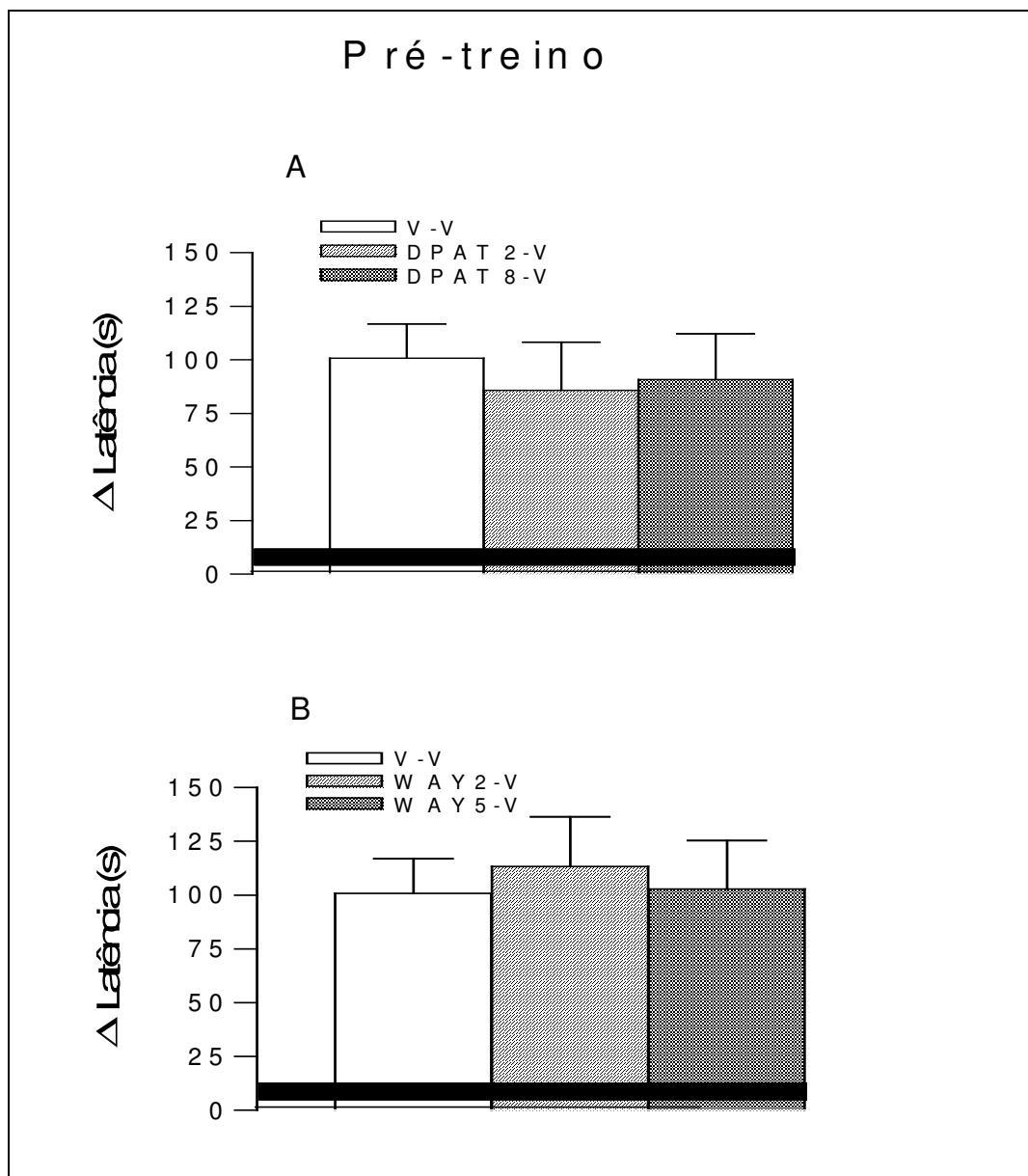


Figura 11. A) Efeito da infusão de DPAT (2 e 8 nmol) e B) efeito da infusão de WAY (2 e 5 nmol) na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiiva inibitória (n= 7-15 por grupo). A barra hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem a média \pm EPM da diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Dunnett.

4.3.3 Efeito da infusão de DPAT e de WAY sobre a atividade glutamatérgica da SCPd em ratos submetidos à tarefa da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

Para avaliação do efeito da infusão do agonista e do antagonista do receptor 5-HT1A sobre a atividade do receptor NMDA na SCPd antes do treino, na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, um total de 205 ratos foram utilizados.

A Figura 12 representa o efeito da infusão de NMDA (25 e 100 pmol), 8-OH-DPAT 8 nmol/veículo, DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd, antes do treino, sobre a aquisição da aprendizagem aversiva da tarefa de esQUIVA inibitória. A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam tratamento farmacológico e o grupo controle. A análise post-hoc revelou que a infusão de NMDA na SCPd, antes do treino, provocou uma redução da latência de descida da plataforma durante a sessão teste nas doses de 25 pmol [$F(5,64) = 9,09$, $p = 0,000376$] e de 100 pmol [$F(5,64) = 9,09$, $p = 0,000049$], quando comparada com o controle. A análise post-hoc revelou efeito significativo para os animais que receberam a infusão veículo/NMDA 100 pmol quando comparado aos grupos DPAT 8nmol/veículo [$F(5,64) = 9,09$, $p = 0,001638$], e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol [$F(5,64) = 9,09$, $p = 0,001377$] e DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol [$F(5,64) = 9,09$, $p = 0,000080$]. Estes resultados indicam que o pré-tratamento com DPAT na dose de 8 nmol preveniu o prejuízo da aquisição do aprendizado aversivo causado pela infusão na SCPd de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol.

A figura 13 representa o efeito da infusão de NMDA 25 pmol, DPAT 8

nmol/NMDA 25 pmol na SCPd, após o treino, sobre a consolidação da aprendizagem aversiva da tarefa de esquiva inibitória. A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam a infusão de NMDA 25 pmol e DPAT8 nmol/NMDA 25pmol. A análise post-hoc revelou que a infusão de veículo/NMDA 25 pmol na SCPd após o treino provocou uma redução [$F(2,22) = 11,33$, $p = 0,00036$], assim como a infusão de DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd após o treino provocou uma redução [$F(2,22) = 11,33$, $p = 0,001686$] da latência de descida da plataforma durante a sessão teste, quando comparada com o controle. Estes resultados indicam que o pré-tratamento com DPAT na dose de 8 nmol não preveniu o prejuízo da consolidação do aprendizado aversivo causado pela infusão na SCPd de NMDA nas doses de 25 pmol.

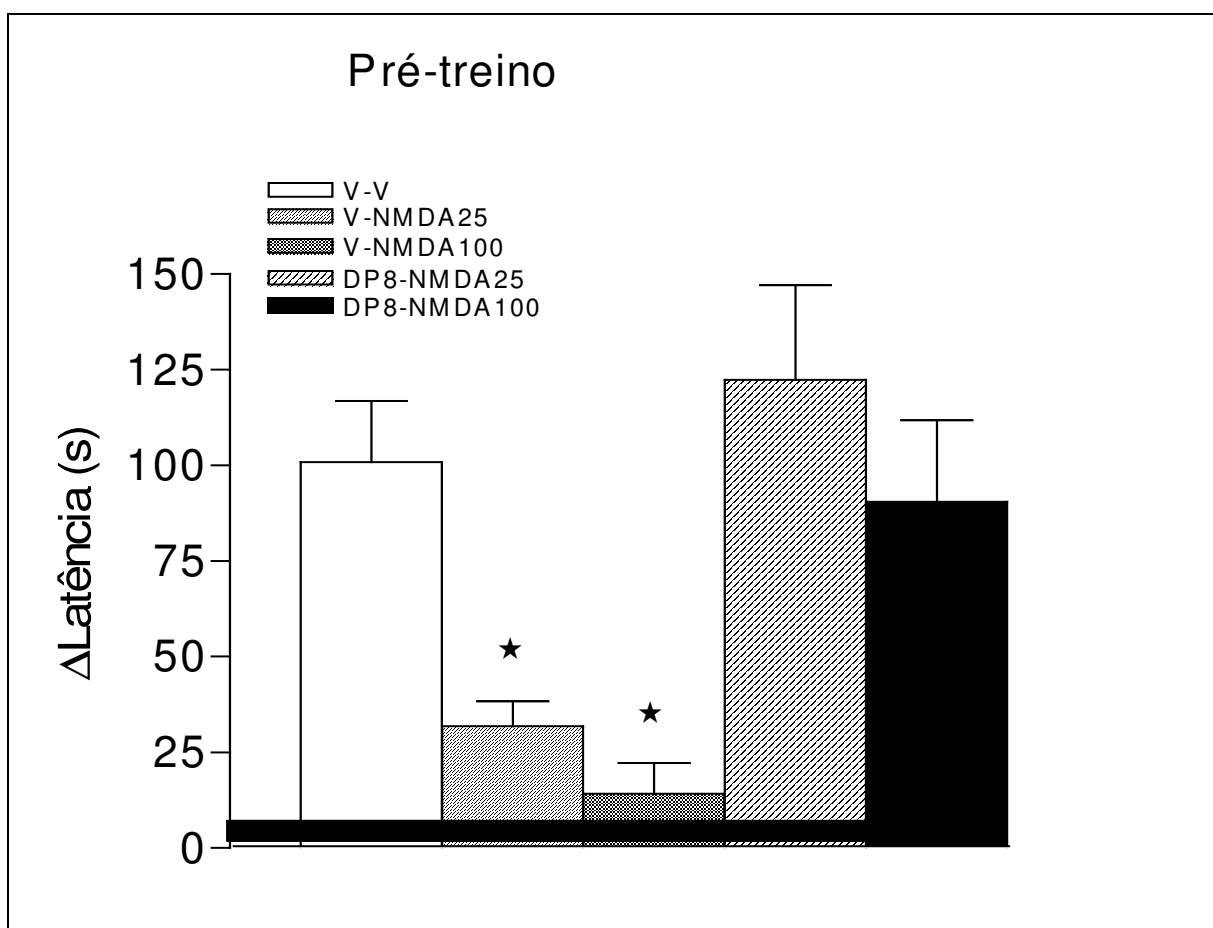


Figura 12. Efeito da infusão de veículo/NMDA (25 e 100 pmol), DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiiva inibitória (n= 7-15 por grupo). A barra hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem a média \pm EPM da diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Duncan * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

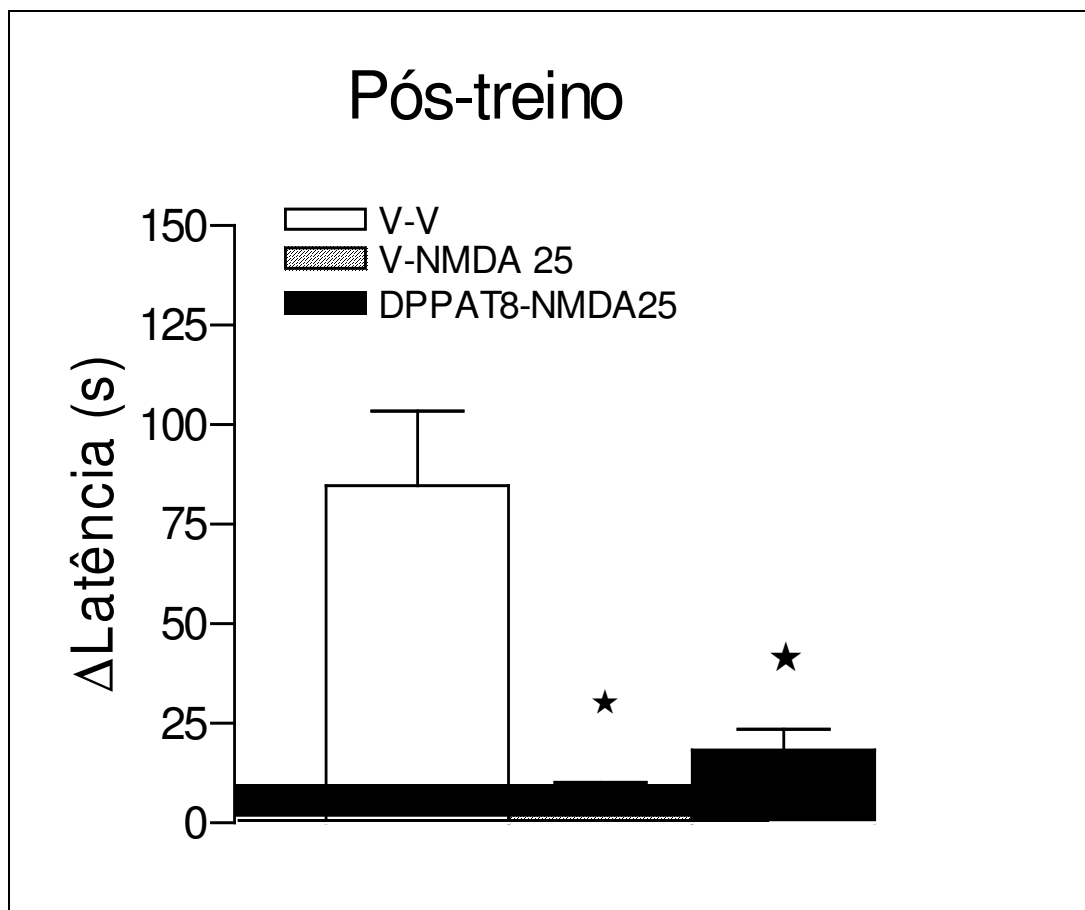


Figura 13. Efeito da infusão de veículo/DPAT 8 nmol e de WAY 5 nmol/DPAT 8 nmol na SCPd, após o treino de ratos submetidos à tarefa de esquiiva inibitória (n= 7-9 por grupo). A barra hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem a média \pm EPM da diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Duncan * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A Figura 14 representa o efeito da infusão de NMDA 25 pmol, WAY (2 e 5 nmol), WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA25 pmol na SCPd, antes do treino, sobre a aquisição da aprendizagem aversiva da tarefa de esquiva inibitória. A ANOVA revelou efeito significativo entre os animais que receberam tratamento farmacológico e o grupo controle. A análise post-hoc revelou que a infusão de NMDA 25 pmol na SCPd antes do treino provocou uma redução [$F(5,56) = 10,22$, $p = 0,000424$] da latência de descida da plataforma durante a sessão teste, quando comparada com o controle, conforme já descrito anteriormente. Da mesma forma, a análise post-hoc revelou que a infusão de WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA25 pmol na SCPd, antes do treino, provocou uma redução [$F(5,56) = 10,22$, $p = 0,000056$ e $p = 0,001509$ respectivamente] da latência de descida da plataforma durante a sessão teste, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados indicam que o pré-tratamento com WAY na dose de 2 e 5 nmol não preveniu o prejuízo da aquisição do aprendizado aversivo causado pela infusão na SCPd de NMDA na dose de 25 pmol.

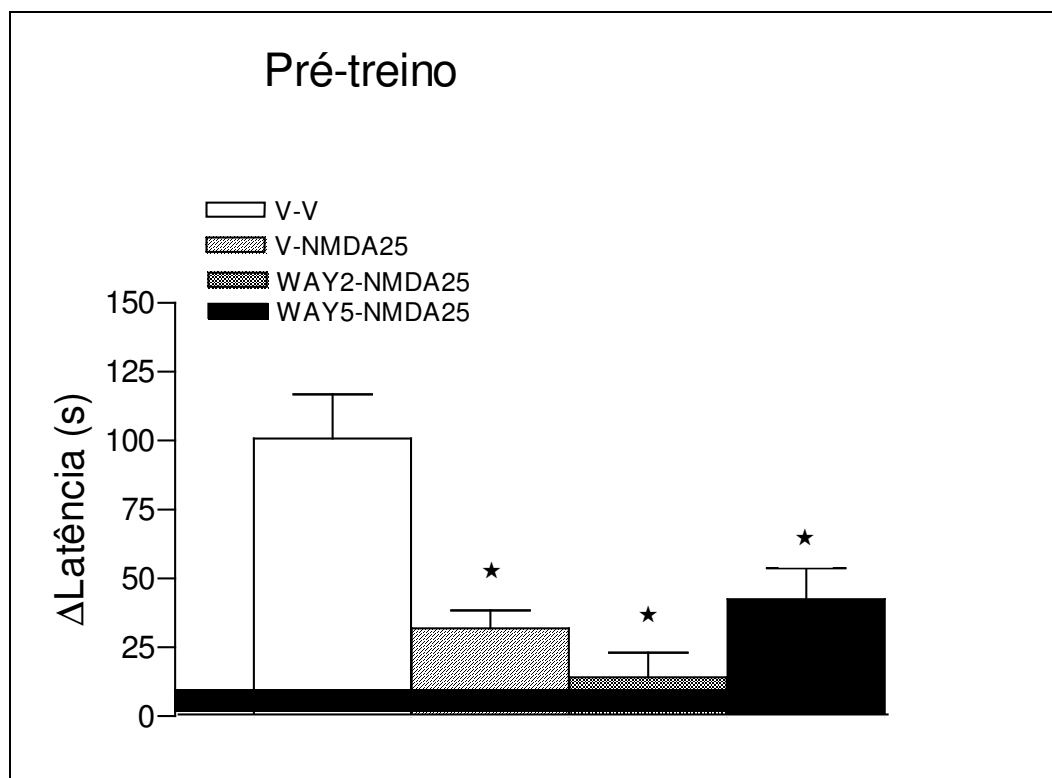


Figura 14. Efeito da infusão de veículo/NMDA 25 pmol, WAY (2 e 5 nmol), WAY 2nmol/NMDA25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória (n= 7-15 por grupo). A barra hachurada representa o intervalo de confiança (95%) em torno da média dos dados obtidos durante a sessão de treino (latência). As barras verticais compreendem a média \pm EPM da diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Dunncan * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a primeira hipótese formulada, evidenciando a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA da SCP dorsal na mediação do comportamento de esquiva observado no LCE e na tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma.

Neste sentido, as evidências que sustentam esta hipótese são as decorrentes dos efeitos obtidos com a infusão do agonista NMDA na SCP dorsal sobre o comportamento de esquiva aos braços abertos de ratos expostos ao LCE, obtidos com a infusão da menor dose de agonista NMDA (25 pmol). Da mesma forma, estão as evidências obtidas no teste da esquiva inibitória, cuja infusão de NMDA na SCP dorsal, antes do treino, prejudicou a aquisição da resposta de esquiva.

Os resultados obtidos no LCE mostraram que a ativação dos receptores NMDA da SCP dorsal, após a infusão do agonista NMDA nas doses de 25 pmol, porém não na dose de 100 pmol, antes do teste, interferiu no comportamento de esquiva observado no LCE. O efeito do tipo ansiogênico observado com a menor dose de NMDA (25 pmol) foi caracterizado por uma redução na exploração dos braços abertos do LCE. Estes resultados corroboram estudos prévios registrando efeitos ansiogênicos relacionados ao uso de agonistas NMDA (DE SOUZA e SCHENBERG, 1998; SCHMITT et al., 1995; CAROBREZ et al., 2001). Entretanto, quando NMDA foi infundido na dose maior, os níveis de exploração dos braços abertos do LCE não foram alterados pelo aminoácido. Muito importante é o fato de que três ratos exibiram um comportamento defensivo evidente, caracterizado por corridas que duraram até um minuto após a injeção de NMDA na dose de 100 pmol, sendo em seguida colocados no LCE. Esta diferença de

comportamento exibido pelos ratos após a injeção de baixa ou alta dose de NMDA caracteriza um efeito em forma de “U”. Este efeito obtido com a injeção de NMDA na SCP dorsal foi previamente observado com a injeção de glicina (TEIXEIRA E CAROBREZ, 1999). Nesse estudo os autores observaram, da mesma forma que em nossos resultados, que a dose de 240 nmol de glicina desencadeou um comportamento defensivo bem mais evidente, devido a um aumento da excitação glutamatérgica da SCP dorsal. Desta forma, a expressão de várias respostas defensivas desde exoftalmia e imobilidade até correr ou pular têm sido demonstradas após a injeção na SCP de NMDA na dose de 200 ou 1000 pmol (BITTENCOURT et al., 2004). O resultado da estimulação da SCP dorsal com aminoácido excitatório já é amplamente descrito na literatura, como já foi citado anteriormente. É importante lembrar que as respostas comportamentais detectadas no LCE envolvem basicamente respostas de conflito e esquiva (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Assim, é provável que a estimulação com NMDA na dose menor tenha desencadeado níveis moderados de medo e produzido comportamento de esquiva, enquanto que na dose maior tal estimulação possa ter evocado níveis elevados de medo e causado uma mudança no modo de resposta do animal para um comportamento defensivo que não pode ser detectado utilizando-se o LCE. Assim, níveis moderados de medo poderiam produzir aumento nas respostas de conflito e esquiva, enquanto níveis elevados de medo produziram outras respostas defensivas, como por exemplo, a fuga. Esta mudança no modo de resposta já foi descrita em pelo menos dois outros estudos (KALYNCHUK et al., 1997; WALKER e DAVIS, 1997). Em um estudo feito por Kalynchuk e colaboradores (1997), com ablação (“kindling”) da amígdala, foi demonstrado que os animais apresentavam um nível extremo de emocionalidade, caracterizado por resistência à captura no campo aberto,

entre outros parâmetros. No entanto, ao serem expostos ao LCE, estes animais apresentaram aumento na atividade nos braços abertos (e não o contrário, que seria o esperado para um efeito ansiogênico) que foi interpretado como tentativa de fuga do LCE. Em concordância com estes estudos estão os resultados de Walker e Davis (1997), através do modelo de sobressalto acústico potenciado pelo medo. Neste estudo, os autores demonstraram que a estimulação química da SCP interfere com a expressão do sobressalto potenciado pelo medo, diminuindo a magnitude do sobressalto. Desta forma, a magnitude do sobressalto parece não estar relacionada à intensidade do medo e à atividade da SCP dorsal. Isto porque níveis moderados de medo produzem sobressalto acústico máximo, enquanto que níveis elevados de medo, produzem outras respostas que parecem não incluir sobressalto. Assim, os autores sugerem que quando a SCP dorsal é ativada por altos níveis de medo esta ativação interfere reduzindo o sobressalto normalmente produzido por moderados níveis de medo (WALKER ET e DAVIS, 1997).

A natureza intrínseca do LCE de ser um modelo capaz de gerar medo, associado com uma elevada excitação neural da SCP dorsal através da injeção de NMDA na dose de 100 pmol, alterou o comportamento defensivo dos sujeitos para um modo mais evidente, porém fora dos limites propostos para detecção dos efeitos ansioseletivos no LCE.

Com relação aos experimentos realizados no teste da esQUIVA inibitória, os resultados mostram que a infusão de NMDA nas doses de 25 e 100 pmol, antes do treino na SCP dorsal, provocou um prejuízo na aquisição da resposta de esQUIVA. Até o presente não existem evidências na literatura de estudos que tenham investigado a

participação do receptor NMDA da SCP dorsal na mediação do comportamento exibido por ratos no teste da esQUIVA inibitória, do tipo descida da plataforma.

Considerando os efeitos obtidos com a infusão de NMDA na SCP dorsal, é possível confirmar sua participação na expressão da resposta de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma. Estes dados vão ao encontro com os dados de Babai e colaboradores (2001), que mostraram um aumento na expressão da proteína Fos na SCP durante o teste neste modelo. A participação de receptores NMDA com processos de aprendizagem está descrita na literatura em distintas áreas cerebrais como hipocampo, amígdala e córtex (BEVILAQUA et al., 2005; CAMMAROTA et al., 2004; HACKL e CAROBREZ 2007; ROESLER et al., 2000; ROESLER et al., 2003; 2005; ZAO et al., 2005). A SCP por sua vez é uma estrutura cerebral mesencefálica que participa na elaboração e expressão de respostas defensivas emergenciais (CARVALHO-NETO et al., 2006; GRAEFF, 2004), desencadeadas por estímulos ameaçadores, e anatomicamente mantém conexões com estruturas cerebrais superiores (VIANA E BRANDÃO, 2003). Desta forma, a sua participação no comportamento defensivo se dá além de uma via final comum na expressão das respostas defensivas, podendo estar envolvida nas respostas de esQUIVA inibitória de ratos submetidos à tarefa de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, que este estudo busca melhor compreender.

O modelo da esQUIVA inibitória é um teste clássico de aprendizagem e memória cuja premissa está baseada na associação que o rato faz do contexto com o choque imediato nas patas em apenas uma sessão de treino (IZQUIERDO et al., 1992, IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Todavia, nesta visão, não há um período de familiarização ao aparato do treino antes da experiência. Sendo assim, o contexto e a experiência ocorrem no mesmo momento, ou seja, durante a sessão de treino. Assim, o

processamento da aquisição e a consolidação da aprendizagem ocorrem na mesma sessão. Nossos dados revelam que a infusão de NMDA na dose de 25 pmol na SCP dorsal imediatamente após o treino interferiu no processo de consolidação da tarefa da esquia inibitória. O processo da consolidação envolve uma série de processos metabólicos em estruturas cerebrais especializadas visando à estabilização e armazenamento do aprendizado em uma memória de longo prazo (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A aquisição e consolidação, no condicionamento aversivo contextual, são dependentes de estruturas cerebrais como a amígdala e o hipocampo, as quais são amplamente envolvidas no processamento de informações emocionais (KIM et al., 1993; PHILLIPS e LEDOUX, 1992; MAREN, 2001). Estudos mostraram que lesões na SCP dorsal antes do treino não alteraram a resposta condicionada de imobilidade durante o teste no modelo de medo contextual (KIM et al., 1993; KLASSEN et al., 2002). Nos modelos de medo condicionado de lugar com um único choque (*immediate footshock*) ou com vários (*massed shock*) e no modelo de sobressalto acústico, no qual a tarefa de medo potencializado foi realizada com choques de alta intensidade, a lesão da SCP dorsal aumentou a resposta condicionada de imobilidade (WALKER e DAVIS, 1997; DE OCA, et al., 1998; KLASSEN et al., 2002). Portanto, além do conhecido envolvimento da SCP dorsal com o comportamento defensivo, esta estrutura parece também estar envolvida com a dinâmica do processamento associativo durante o condicionamento. Assim, no presente estudo, os resultados mostram que a ativação dos receptores do tipo NMDA da SCP dorsal prejudicam a aquisição e consolidação da resposta de esquia de ratos submetidos à tarefa da esquia inibitória, sugerindo o envolvimento da SCP dorsal na tarefa de esquia inibitória. O estudo sugere que a estimulação da SCP dorsal com aminoácido excitatório é biologicamente mais relevante

do que o choque nas patas e, portanto, após a estimulação com NMDA o rato perde a capacidade de discriminar a tarefa, semelhante ao efeito obtido no LCE com a dose maior de NMDA.

Por outro lado, a literatura descreve o envolvimento da SCPd com o processamento e a modulação da dor. Estudos feitos por Reynolds (1969) já evidenciaram que a estimulação da SCPd produzia analgesia. Seguiram-se vários estudos com a injeção de aminoácido excitatório (NMDA) na SCPd observando seu efeito analgésico (JENSEN e YAKSH, 1992; VACCARINO et al., 1997; BERRINO et al., 2001; MIGUEL e NUNES-DE-SOUZA, 2006). Desta forma, uma outra hipótese sugerida neste trabalho seria o efeito analgésico interferindo no aprendizado, fazendo com que o animal no dia do teste tenha a latência de descida da plataforma prejudicada. Para sustentar ou não esta hipótese, futuros trabalhos serão necessários.

As projeções serotoninérgicas que chegam a SCP dorsal são originárias do núcleo dorsal da rafe (NDR) (VIANA e GRAEFF, 1997) que é uma fonte importante de serotonina da via meso-corticolímbica (LOWRY et al., 2005). O efeito ansiolítico da neurotransmissão serotoninérgica na SCP dorsal têm sido demonstrado com a redução do comportamento de defesa após a ativação do receptor 5-HT_{1A} em ratos submetidos aos labirintos elevados (GRAEFF, 2002; DE PAULA e ZANGROSSI, 2004). Neste estudo, tanto o agonista 5-HT_{1A} DPAT quanto o antagonista 5-HT_{1A} WAY, nas doses utilizadas não alteraram o desempenho dos ratos submetidos ao LCE e ao teste da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

Resultados semelhantes foram observados no estudo de De Paula Soares e Zangrossi (2004), no qual antagonistas de receptores do tipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, por si só, não alteraram o comportamento dos animais no labirinto em T elevado.

Embora evidências na literatura tenham demonstrado que a ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos podem levar a uma inibição neuronal em áreas cerebrais como hipocampo, septo e SCP (GRIEBEL, 1995; GRAEFF, 2002; DE PAULA E SOARES 2004) promovendo um efeito do tipo ansiolítico, a ausência dos efeitos aqui observados sugere que diferentes modelos experimentais podem gerar uma diversidade de respostas emocionais do comportamento defensivo de ratos.

Vários trabalhos têm sido conduzidos para caracterizar os efeitos da ativação e inativação dos receptores 5-HT_{1A} da SCP dorsal através de outros modelos experimentais que avaliam aspectos emocionais do comportamento defensivo (GRIEBEL, 1995). Em um estudo conduzido por Zanovelli e colaboradores (2003), os autores mostraram que a infusão de DPAT na SCP dorsal prejudica a fuga gerada pela exposição do rato a um dos braços abertos do labirinto em T elevado. Este modelo, baseado na aversão inata que roedores apresentam por lugares abertos, permite o estudo, em um mesmo animal, de dois tipos de respostas defensivas: a esquia inibitória e a fuga. Tais comportamentos têm sido associados, respectivamente, a ansiedade generalizada e ao distúrbio do pânico em humanos (GRAEFF et al., 1993). A literatura mostra que a ativação do receptor 5-HT_{1A} pelo agonista DPAT na SCP dorsal de ratos avaliados no labirinto em T elevado resulta em um perfil ansiolítico (ZANGROSSI et al., 2001; ZANOVELLI et al., 2003; DE PAULA SOARES et al., 2004; POBE e ZANGROSSI, 2005), bem como diminui o limiar aversivo para estimulação elétrica (NOGUEIRA e GRAEFF, 1995). No hipocampo, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} de ratos avaliados no LCE demonstram um perfil ansiogênico (FILE E GONZALEZ, 1996), e ansiolítico no teste da vocalização ultrassônica (SCHREIBER e DE VRY, 1993) e no teste de conflito de Vogel (MILAN, 2003). Na amígdala, a ativação

dos receptores 5-HT_{1A} de ratos avaliados no teste da interação social demonstrou um perfil ansiogênico (GONZALEZ, 1996), e no modelo do labirinto em T elevado um efeito ansiolítico (ZANGROSSI et al, 1999). Como exposto acima, tanto as áreas cerebrais distintas quanto o uso de diferentes modelos experimentais para avaliar o comportamento defensivo envolvem a utilização de diferentes estratégias de defesa quando o animal é confrontado com o modelo, o que pode explicar a inconsistência dos resultados.

Os resultados do presente estudo também sustentam a segunda hipótese formulada, pois foi mostrado que os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} da SCP dorsal desempenham um papel modulatório sobre os receptores subtipo NMDA nesta estrutura na mediação do comportamento defensivo.

Nesse sentido, a evidência que sustenta esta hipótese é decorrente do pré-tratamento de DPAT e WAY na SCP dorsal, cujo resultado mostrou o efeito modulatório do receptor 5-HT_{1A} sobre a atividade glutamatérgica no comportamento de esquiva de ratos expostos ao LCE e ao teste da esquiva inibitória. Nossos resultados mostram que embora nem o agonista 5-HT_{1A} DPAT nem o antagonista 5-HT_{1A} WAY injetados na SCP dorsal foram capazes de alterar o comportamento de esquiva no LCE *per se*, ambos compostos interferiram no comportamento desencadeado por ativação da SCP dorsal pela injeção de NMDA. Assim, embora a dose de 25 pmol de NMDA injetada na SCP dorsal tenha produzido um efeito do tipo ansiogênico, o nível de exploração aos braços abertos observado em ratos que receberam NMDA na dose de 25 pmol, mas foram pré-tratados com antagonista 5-HT_{1A} WAY na dose de 5 nmol, foi similar ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a atividade glutamatérgica na SCP dorsal pode estar sobre o controle da ativação do receptor 5-HT_{1A}.

Por outro lado, a falta de efeito observado pela maior dose de 100 pmol de NMDA no LCE foi alterada pelo pré-tratamento com DPAT (2 e 8 nmol), tornando a dose de 100 pmol ansiogênica. Em conjunto, estes resultados mostram uma interação entre a função glutamatérgica e serotoninérgica na mediação de respostas aversivas mediadas pela SCP dorsal. Observa-se, com os resultados, que a ausência dos efeitos comportamentais pela injeção na SCP dorsal de DPAT e WAY *per se*, e os efeitos sobre a atividade glutamatérgica são indicativos de que o receptor 5-HT_{1A} na SCP dorsal deve ser recrutado para uma ação regulatória.

Evidências na literatura têm demonstrado o envolvimento de receptores ionotrópicos glutamatérgicos da SCP dorsal no comportamento defensivo (DEPAULIS e BANDLER, 1988; GUIMARÃES et al. 1991; MOLCHANOV e GUIMARÃES, 2002; BERTOGLIO e ZANGROSSI, 2006), a possibilidade de como a serotonina e glutamato interajam na SCP dorsal na modulação do comportamento defensivo está baseado em evidências de que o agonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, DPAT antagoniza os efeitos aversivos induzidos por microinjeção de aminoácido excitatório na SCP dorsal (BECKETT et al., 1992; BECKETT E MARSDEN, 1995) da mesma forma que atenua o limiar para estimulação elétrica na SCP dorsal para respostas de fuga (JENCK e BROEKKAMP 1989). Por outro lado, a ativação do receptor 5-HT_{1A} da SCP com DPAT atenua a resposta comportamental evidenciada pela estimulação do hipotálamo medial (SHAIKN et al., 1997). Como a via glutamatérgica hipotálamo medial-SCP dorsal está envolvida na mediação de respostas defensivas (BEART et al., 1988; LU et al., 1992; SILVEIRA E GRAEFF, 1988), a atenuação do comportamento defensivo no hipotálamo após a injeção de DPAT na SCP dorsal está de acordo com a sugestão de interação entre transmissão glutamatérgica e serotoninérgica na SCP dorsal.

Ainda que não sejam claros os mecanismos de modulação entre o sistema glutamatérgico e serotoninérgico, a literatura tem sugerido ainda que projeções serotoninérgicas para a SCP dorsal terminem sobre interneurônios GABA modulando desta forma a resposta comportamental (BRANDÃO et al., 1999). De forma semelhante, Matsuyama e colaboradores (1996, 1997) sugerem que também em outra estrutura cerebral como o giro dentado, tanto receptores NMDA quanto 5-HT_{1A} se encontram localizados sobre neurônios GABAérgicos, exercendo desta forma um efeito regulatório excitatório e inibitório da liberação de GABA. O envolvimento do receptor 5-HT_{1A} na redução da despolarização induzida pelo aminoácido excitatório também foi demonstrada no lócus coeruleus (CHARLÉTY et al., 1991).

Da mesma forma, ainda que não sejam claros os mecanismos pelos quais o receptor 5-HT_{1A} exerce seu efeito modulatório sobre a atividade glutamatérgica, um estudo importante de Yuen e colaboradores (2005) mostra que no córtex pré-frontal, estrutura cerebral criticamente envolvida na regulação de processos emocionais e cognitivos, a ativação do receptor 5-HT_{1A} inibe a corrente iônica do receptor NMDA por alterar a subunidade NR2B, diminuindo desta forma a atividade glutamatérgica e modulando, assim, processos emocionais e cognitivos mediados pelo córtex pré-frontal.

Em relação ao efeito do tipo modulatório promovido pelo subtipo de receptor 5-HT_{1A} da SCP dorsal sobre a atividade glutamatérgica nas respostas comportamentais defensivas de medo e ansiedade, de acordo com o exposto acima, muitos estudos ainda são necessários para investigar de que forma este comportamento é modulado. No entanto, de acordo com a literatura, a possibilidade da interação entre subtipos de receptores serotoninérgicos na SCP dorsal (DE PAULA SOARES e ZANGROSSI, 2004;

NUNES DE SOUZA et al., 2008), ou a participação do sistema noradrenérgico (AUDI et al, 1989), podem de alguma forma participar da resposta comportamental final.

A modulação serotoninérgica sobre o sistema glutamatérgico na SCP dorsal na mediação do comportamento de exploração dos braços abertos do LCE reforça a função da SCP dorsal em um comportamento defensivo mais sutil. A ausência de respostas como congelamento ou fuga, observadas com o uso de agonistas de AAE, e a exploração aos braços abertos foi bidirecionalmente modificada quando a maior dose de NMDA foi utilizada após a injeção de DPAT ou quando a menor dose foi utilizada após a injeção de WAY.

Os resultados obtidos com a infusão do agonista 5-HT_{1A} DPAT nas doses de 2 e 8 nmol e do antagonista 5-HT_{1A} WAY nas doses de 2 e 5 nmol na SCP dorsal por si só não foram capazes de interferir na aquisição da resposta de esquiva no teste da esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Alguns estudos mostraram o envolvimento da SCP dorsal mediando um componente aversivo (BECKETT e MARSDEN, 1995; DIELEMBERG et al., 2004; MARTINEZ et al., 2006; MONGEAU et al., 1998), sugerindo uma função que interfere no desempenho do comportamento motivado pelo medo em que a SCP inibe a amígdala ou outras estruturas cerebrais envolvidas no processamento do estímulo que provoca o medo (FENDT e FANSELOW, 1999, MARTINEZ et al., 2006).

O presente estudo também mostrou que o pré-tratamento com o agonista do receptor 5-HT_{1A} DPAT reverteu o prejuízo da resposta de esquiva aversiva causado pela infusão na SCP dorsal de NMDA, porém, não foi capaz de interferir no prejuízo da consolidação do aprendizado da esquiva aversiva causado pela infusão de NMDA na SCP dorsal. Este resultado sugere que o receptor 5-HT_{1A} da SCP dorsal exerce um

papel modulatório na elaboração das respostas defensivas e não quando já houve exposição prévia a uma experiência aversiva e já houve o processamento da resposta, como é o caso da fase de consolidação da informação aversiva. Outra hipótese sugerida é que a estimulação elétrica nas patas que antecede a estimulação química da SCP dorsal poderia estar promovendo uma grande liberação de glutamato em várias áreas cerebrais causando uma ativação neuronal tão intensa que possa estar interferindo no processo de modulação serotoninérgica na SCP dorsal. Consistente com esta visão é a possível interação da SCP com estruturas mais rostrais no cérebro, modificando o processamento das informações (VIANA e BRANDÃO, 2003).

Considerando ainda que a ativação da SCPd com NMDA tenha propriedades analgésicas, o pré-tratamento com o agonista do receptor 5-HT_{1A} pode reverter o prejuízo da esquiva por interferir na analgesia e, desta forma, favorecer a esquiva. Futuros experimentos serão necessários para melhor evidenciar esta possibilidade.

Diante dos resultados obtidos com a infusão do agonista do receptor NMDA na SCP dorsal, que mostrou que a ativação deste receptor modifica a resposta defensiva de ratos submetidos ao LCE e ao teste da esquiva inibitória, e que o pré-tratamento com o agonista do receptor 5-HT_{1A} é capaz de suprimir a excitação sináptica mediada pelo receptor NMDA na SCP dorsal, é possível sugerir que esta região esteja envolvida com a modulação de respostas de esquiva do comportamento defensivo, independentemente do tipo de estímulo aversivo empregado, cuja detecção pelo rato envolveu a participação de diferentes modalidades sensoriais.

O significado funcional do receptor 5-HT_{1A} na cognição foi avaliado, sobretudo sistemicamente (para revisão ver MENESES e HONG, 1999; LÜTTGEN et al., 2005; MENESES e PEREZ-GARCIA, 2007) e os resultados contrastam com os obtidos com

este estudo, uma vez que o agonista do receptor 5-HT_{1A} causa prejuízo nas tarefas cognitivas (LÜTTGEN et al., 2005), possivelmente por modular a transmissão glutamatérgica e colinérgica, reduzindo a excitabilidade neuronal destes sistemas em áreas cerebrais como hipocampo, córtex e amígdala (EDAGAWA et al., 1999; LIANG, 1999; MADJID et al., 2005). Em estudos feitos por Örgren e colaboradores (ÖRGREN et al., 2008) a ativação do receptor 5-HT_{1A} por DPAT por via sistêmica em baixas doses favorece e em altas doses prejudica a esquia quando injetados antes do treino na tarefa da esquia inibitória do tipo descida da plataforma. Os autores sugerem que doses maiores podem ativar receptores 5-HT_{1A} localizados no hipocampo, levando desta forma a uma inibição dos receptores glutamatérgicos através de uma hiperpolarização dos neurônios hipocampais. Isso prejudica a via de sinalização dos mecanismos intracelulares necessários para o processamento da memória e provoca um prejuízo na aquisição da esquia. Os mesmos autores confirmaram esta hipótese porque o uso de antagonista 5-HT_{1A} bloqueou completamente o prejuízo da esquia causado pelo uso do DPAT no hipocampo. Por outro lado, a literatura também sugere que o processamento da consolidação do componente aversivo da memória mediado pelos receptores do tipo NMDA possa ser modulado através do sistema serotoninérgico via interneurônios GABA (STUTZMANN e LEDOUX, 1999).

Diante dos resultados obtidos com a infusão do agonista do receptor NMDA na SCP dorsal, em que foi mostrado que a ativação dos receptores NMDA afetou a resposta defensiva de ratos submetidos ao LCE e à esquia inibitória, é possível sugerir que esta região esteja envolvida com a mediação da resposta de esquia do comportamento defensivo. Os resultados sugerem ainda que haja uma interação funcional entre os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e serotoninérgicos do tipo

5-HT_{1A} da SCP dorsal do tipo modulatória, na mediação da resposta de esquiva do comportamento defensivo.

Em resumo, os resultados obtidos sugerem o envolvimento do receptor 5-HT_{1A} da SCP dorsal na mediação de componentes de esquiva do comportamento defensivo através da modulação do sistema glutamatérgico e, desta forma, sugerem que a SCP dorsal é fundamental na expressão de respostas defensivas de esquiva exibidas frente a situações ameaçadoras tanto de aspecto mais sutil quanto com um caráter mais aversivo. Desta maneira, nossos resultados mostram a importância da SCP dorsal em comportamentos defensivos sugerindo que esta estrutura pode influenciar componentes de esquiva do comportamento defensivo reforçando o papel fundamental da mesma já descrito na literatura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.B. Brain mechanisms of aggressive behavior. An updated review. *Neurosci. And Biobehavi Revi.* 2006;304-318.

ALBIN, R.L. MAKOWIEC, R.L., HOLLINGSWORTH, Z., DURE, I.V.L.S., PENNEY, J.B., YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci. Lett.* 1990; 118:118-115.

ARGYROPOULOS, S.V., SANDFORD, J.J., NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol. Ther.* 2000; 88:213-227.

ATZMITIA, E.C. & SEGAL, M. Na autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe. *The Journal of Comparative Neurology.* 1978; 179:641-668.

AUDI, E.A.; DE-OLIVEIRA, C.E.; GRAEFF, F.G. Serotonergic mediation of the anxiolytic effects of intracerebrally injected propranolol measured in the elevated plus-maze. *Brazilian J. Med Biol Res.* 1989;22:699-701.

BABAI, P.; ANOKHIN, K.V.; DOLGOV, N.; SUDAKOV, K.V. Characteristics of c-fos gene expression in the brains of rats with different investigative and defensive behaviors. *Neurosci Behav Physiol.* 2001;31(6):583-8.

BANDLER, R. & CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey regions of the unrestrained cat. *Brain Research,* 1988; 439, 95-106.

BANDLER, R. & DEPAULIS, A. Elicitation of intra-specific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci. Lett.* 1988;88(3):291-6.

BANDLER, R. & DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A., Bandler, R. (eds). *The midbrain periaqueductal gray matter.* New York: Plenum Press, 1991; 175-198.

BEART PM, NICOLOPOULOS LS, WEST DC, HEADLEY PM. An excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and electrophysiological evidence. *Neurosci Lett,* 1988;85: 205-11.

BECKETT, S. & MARSDEN, C.A. Computer analysis and quantification of periaqueductal gray-induced defense behavior. *J. Neurosc. Methods* 1995;58:157-161.

BECKETT, S.& MARSDEN, C.A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and the 5-HT_{1A} antagonist WAY 100635 on periaqueductal gray-induced defense behavior. *Psychopharmacology*, 1997;11(1):35-40.

BECKETT, S.R. LAWRENCE, A J., MARSDEN, C.A, MARSHALL, P.W. Attenuation of chemically induced defense response by 5-HT_{1A} receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 1992;108(1-2):110-4.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.*1995; 46:575-605.

BEITZ, A.J. & SHEPARD, R.D. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A golgi analysis. *J. Comp. Neurol.* 1985; 237:460-475.

BEITZ, A.J. Central gray. In: Paxinos G.(ed). *The human Nervous System*. 1 ed. San Diego, Academic Press, 1990;p. 307-320.

BEITZ, AJ. Periaqueductal gray. In: Paxinos, G. (ed).*The rat nervous system*. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1995;p173-182.

BENNETT, D.A. & AMRICK, C.L. Antagonist at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: *Excitatory amino acid transmission*. New York, 1987;p.213-216.

BERRINO, L; OLIVA, P.; ROSSI. F.; PALAZZO, E.; NOBILI, B.; MAIONE, S. Interaction between metabotropic and NMDA glutamate receptors in the periaqueductal grey pain modulatory system. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2001; 364(5):437-43.

BERGINK, V; VAN MEGEN, J.G.M.; WESTENBERG, H.G.M. Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology* 2004, 3:175-183.

BERTOGLIO, L.J. & CAROBREZ, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Psychopharmacology*. 2003;170(4):335-342.

BERTOGLIO, L.J. & CAROBREZ, A.P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain Res.* 2002; 14;132(2):135-43.

BERTOGLIO, L.J.& ZANGROSSI, H.J. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in rat elevated T-maze. *Behav. Pharmacol.* 2006;17(7):589-96.

BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Memory consolidation induces N-methyl-D-aspartic acid-receptor- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-dependent modification in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor properties. *Neuroscience* 2005;136(2):397-403.

BITTENCOURT AS, CAROBREZ AP, ZAMPROGNO LP, TUFIK S, SCHENBERG LC. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of n-methyl-d-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, 2004;125: 71-89.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; CAROBREZ, A.P.; VENIEGAS, R.J.; SHEPHERD, J.K. MK801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology*. 1992; 108:352-362.

BLANCHARD, R.J. & BLANCHARD, D.C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J. Comp. Physiol Psychol* 1969; 68(1):129-35.

BLANCHARD, R.J. & BLANCHARD, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. Review.* 1989;13 Suppl:S3-14.

BLANCHARD, R.J. & BLANCHARD, D.C. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* Winter.1990; 14(4):463-72.

BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361,31-39.

BRANDÃO.M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and biobehavioral Reviews*, 1999; 23:863-875.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATTO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, N. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotx. Res*, 2004;6(3):205-12.

CANTERAS, N. & SWANSON, L. Projections of the ventral subiculum to the amygdale, septum, and hypothalamus: a PHAL, anterograde tract-tracing study in the rat. *J.Comp. Neurol.* 324:180-194, 1992.

CANTERAS, N.S.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:661–668, 2001.

CANTERAS, N. S., KROON, J.A., DO-MONTE, F.H., PAVESI, E., CAROBREZ, A.P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurisc. Biobehav. Rev.* In press. In press, 2008.

CAROBREZ, A.P. Mediação da reação de defesa por aminoácidos excitatórios. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1987.

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2003;25(2):52-58.

CAROBREZ, A.P.& BERTOLGIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2005;1193-2005, 2005.

CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2001;25, 697-709.

CARVALHO-NETO, E.F.; MARKHAM, C.; BLANCHARD, D.C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, R.J. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006; 85:140-147.

CHARLETE, P.J.; ASTON-JONES, G.; AKAOKA, H.; BUDA, M.; CHOUVET, G. Participation of 5-HT 1A receptors in the decrease by serotonin of activation of locus coeruleus neurons by glutamate. *C.R.Acade. Sci.III* 1991;312(8):421-6.

COLLINGRIDGE, G.L. & LESTER, R.A. Excitatory amino acid receptor in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol.* 1989;41(2):143-210.

DE PAULA SOARES, V. & ZANGROSSI, JR.H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the periaqueductal gray in the regulation of defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 2004; 64:181-188.

DE SOUZA MM, SCHENBERG LC, DE PÁDUA CAROBREZ A. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav Brain Res*, 1998;90: 157-65.

DE OCA, B.M.; DECOAL, J.P.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *The Journal of Neuroscience*, 1998;18(9):3426-3432.

DEAKIN, J.F.W. & GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacology*, 1991; 5:305-315.

DI SCALA, G.; MANA, M.J.; JACOBS, W.J.; PHILLIPS, A.G. Evidence for pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal gray in the rat. *Physiol. Behav.* 1987;40:55-63.

DIELEMBERG, R.A.; LEMAN, S.; CARRIVE P.; Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. *Behavioral Brain Research* 2004; 153: 487–496.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S.; Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 1989; 169(1):1-10.

EDAGAWA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. Stimulation of the 5-HT_{1A} receptor selectively suppresses NMDA receptor-mediated synaptic excitation in rat visual cortex. *Brain Research* 1999, 827:225-228.

EISENBERG, E.; ALON, N.; ISHAY, A.; DAOUD, D.; YARNITSKY, D. Lamotrigine in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Eur J Neurol.* 1998;5(2):167-173.

EISON, A. S. & TEMPLE, D.L. Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on the mechanisms of action. *Am J. Med.* 80:1-9, 1989.

ENGIN, E. & TREIT, D. The effects of intra-cerebral drugs infusion on animals' unconditioned fear reactions: A systematic review. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008. Accepted for publication in 26 March 2008.

FANSELOW, M.S. Conditioned and unconditioned components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.*, 1980; 15(4):177-82.

FANSELOW, M.S. Neural organization of the defense behavior system responsible for fear. *Psychonom. Bull. Rev.* 1994;1:429-438.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In; Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.). *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York. Plenum, 1991; pp.151-173.

FILE, S.E.; GONZALES, L.E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal model test. *The J. of Neurosci.* 1996;16(15):4810-4815.

GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology* 1986; 46, 87-98.

GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the interaction social test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res.* 1996;732:145-153.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1981; 14:239-265.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology* 2002; 163:467-476.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defense behavior and anxiety. *Rev. Neurosci* 1993; 4(2):181-211.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28(3):239-59.

GRAEFF, F.G. & GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Atheneu: São Paulo, 2001.

GRAEFF, F.G.; VIANNA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian J. Med Biol Res* 1993; 26:67-70.

GRAEFF, F.G.; CAROBREZ, A.P.; SILVEIRA, M.C.L.. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavaleiro, E.A., Lehmann, J., Tursky, L. (eds). *Neurology and*

Neurobiology, vol 46. Frontiers in excitatory amino acids research. New York: Liss, 1988; p-325-332.

GRAY, J. The Neuropsychology of anxiety. Oxford. University Press, New York. 1982.

GRAY, J.A. & MACNAGTHON, N. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. J. Affect Disord. 2000b; 61(3):161-76.

GRAY, J.A. & MCNAUGHTON N. The Neuropsychology of anxiety. 2nd ed. New York: Oxford University Press, pp.1-424, 2000a.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. Pharmacol Ther 1995, 65(3): 319-395.

GRIEBEL, G.; BELZUNG, C.; MISSLIN, R.; VOGEL, E. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT(1A) receptor antagonists in three rat models of anxiety. Neuropharmacol. 2000; 24;39(10):1848-57.

GRIFFITHS, J.L. & LOVICK, T.A. Co-localization of 5-HT_{2A} receptor and GABA-immunoreactivity in neurons in the periaqueductal gray matter on the rat. Neurosci. Lett. 2002; 326(3):151-4.

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. Psychopharmacology 1991;103(1):91-94.

HÄCKL, L.P.N. & CAROBREZ, A.P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. Neurobiology and Learning and Memory. 2007;88(2):177-85.

HANDLEY, S. L. & MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonist in a maze-exploration model of "fear"- motivated behavior. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 1984; 327,1-5.

HANDLEY, S.L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. Pharmacol. Ther.1995;66(1):103-48.

HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptor. Annual Review Neuroscience, 1994; 17:31-108.

IZQUIERDO, I., & MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning Memory* 1997; 68, 285-316.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 1992; 58(1):16-26.

JENCK F, BROEKKAMP CL, VAN DELFT AM. Effects of serotonin receptor antagonists on PAG stimulation induced aversion: different contributions of 5HT1, 5HT2 and 5HT3 receptors. *Psychopharmacology*, 1989;97: 489-95.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. *Brain Res.* 1992; 569 (2):255-67.

KALYNCHUK, L.E.; PINEL, J.P.J.; TREIT, D.; KIPPIN, T.E. Changes in emotional behaviors produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol. Psych.* 1997;41:438-451.

KEHNE, J.H.; MCCLOSKEY, T.C.; BARON, B.M.; CHI, E.M.; HARRISON, B.L.; WHITTEN, J.P.; PALFREYMAN, M.G. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *Eur.J. Pharmacol.* 1991;193; 14:20-25.

KIM, J.J.; RISON, R.A.; FANSELOW, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience* 1993; 107(6):1093-1098.

KLASSEN, J.J.; WILLIAMS, D.A.; BOLSTER, B.; TAIT, R.W. Influence of dorsolateral periaqueductal grey (dIPAG) lesions on contextual conditioning with massed and distributed shock. *Q J Exp Psychol B.* 2002;55(1):27-42.

KORTE, S.M. & DE BOER, S.F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacol.* 2003; 463:163-175.

KRIEGER, J.E. & GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1985;18:61-67.

LEDOUX, J. O cérebro emocional. Rio de Janeiro. Ed Objetiva. 1998.

LEESON, P.D. & IVERSEN, L.L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 1994;25;37(24):4053-67.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência. São Paulo. Atheneu. 2004.

LIANG, K.C. Pre or post-training injection of buspirone impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of amygdale 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Of Neurosc.* 1999;1:1491-1500.

LICATA, F.; VOLSI, G. L.; CIRANNA, J. 5-Hydroxytryptamine modifies neuronal responses to glutamate in the red nucleus of the rat. *Exp Brain Res* 1998, 118:61-70.

LISTA, A.; BLIER, P.; DEMONTIGNY, C. Benzodiazepine receptor modulate 5-hydroxytryptamine neurotransmission in the rat hippocampus; in vivo electrophysiological evidence. *Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254(1):318-23.

LOVICK, T.A.; PARRY, T.M.; STEZHKA, V.V.; LUMB, B.M. Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behavior: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience* 2000, 95(3):763-72.

LOWRY CA, JOHNSON PL, HAY-SCHMIDT A, MIKKELSEN J, SHEKHAR A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress*, 2005;8: 233-46.

LU CL, SHAIKH MB, SIEGEL A. Role of NMDA receptors in hypothalamic facilitation of feline defensive rage elicited from the midbrain periaqueductal gray. *Brain Res*, 1992;581: 123-32.

LUJÀN, R.; SHIGEMOTO, R.; LÓPEZ-BENDITO, G. Glutamate and GABA receptor signaling in the developing brain. *Neuroscience*, 2005;130:567-580.

LÜTTGEN, M.; ELVANDER, E.; MADJID, N.; ÖGREN, S.O. Analyses of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the rat. *Neuropharmacol.* 2005;48:830-852.

MACNAUGHTON, N. & CORR, O.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defense distance. *Neurosci. Biobehav Rev.* 2004. may; 28(3):285-305.

MADJID, N.; ELVANDER, T.E.; LÜTTGEN, M.; MEISTER, B.; SANDIN, J.; KUZMIN, A.; STIDL, O.; ÖGREN, S.O. 5- Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates

aversive learning in mice: Interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 316:581-591.

MANTYH, P. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observation in the cat and rat. *J. Comp. Neuro*. 1982a;206:146-158.

MANTYH, P. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a Nissl, Weil and Golgi analysis. *J. Comp. Neuro*. 1982b; 204:349-363.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rv.Neurosc. Review* 2001;24:897-931.

MARTINEZ, R.C.R.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol of Learning and Memory* 2006, 85:58-65

MARTINEZ, R.C.R.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. *Ur Neuropsychopharmacol*. 2007;17(11):717-24.

MATSUYAMA, S.; NEI, K.; TANAKA, C. Regulation of GABA release via NMDA and 5-HT_{1A} receptor in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res*. 1997; 761(1):105-12.

MATSUYAMA, S.; NEI, K.; TANAKA, C. Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT_{1A} receptor in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res*. 1996;728(2): 175-80.

MAURA, G.; MARCOLI, M.; PEPICELLI, O.; VIOLA, C.; RAITERI, M. Serotonin inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide cycli GMP pathway in human neocortex slices: involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors. *Br. J. Pharmacol*. 2000;130(8):1853-8.

MCCULLOCH, J. Excitatory amino acid antagonist and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *Br J. Clin. Pharmacol*. 1992; 34:106-114.

MELDRUM, B. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology *J Nutr. Review*. 2000;130(4):1007-15.

MELDRUM, B. Possible therapeutic applications of antagonist of excitatory amino acid neurotransmitters. *Cli. Sci*. 1985; 68:113-122.

MENARD, J. & TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23(4): 591-613, 1999.

MENESES, A., & PEREZ-GARCIA, G. 5-HT_{1A} receptors and memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2007; 31(5):705-77.

MENESES, A.; HONG, E. 5-HT_{1A} receptor modulate the consolidation of learning in normal and cognitively impaired rats. *Neurobiol. of Learning and memory* 1999; 71:207-218.

MENESES, A.; TERRON, J.A Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor in the facilitatory response induced by 8-OH-DPAT on learning consolidation. *Behavioral Brain Research* 2001; 21:21-28.

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend of nitric oxide synthesis. *Brain Res.* 2006; 1076(1):42-8.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 2003; 70:83-244.

MOLCHANOV, M.L. & GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP-7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 2002; 160, 30-38.

MONGEAU, R.; DE OCA, B.; FANSELOW, M.S.; MARDSEN, C.A. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditioned and unconditional fear behaviors in rats. *Behavioral Neuroscience* 1998; 112(5):1125-1135.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J.Comp Physiol Psychol. Berlim.* 1955; 48(4)24-60.

MORRIS, R.G.M. & DAVIS, M. The role of NMDA receptors in learning and memory. In: G.L. Colingridge & J.C.Watkins (eds). *The NMDA receptor*. Pp 340-375. Oxford: Oxford University Press. 1984.

MOULIGNIER, A. Central serotonergic receptors. Principal fundamental and functional aspects. Therapeutic applications. *Rev. Neurol.* 1994;150(1):3-15.

NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGTER, D.G. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosur* 30:14-24, 1969.

NOGUEIRA, R.L. & GRAEFF, F.G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 52(1);1-6, 1995.

NUNES DE SOUZA, V.; NUNES DE SOUZA, R.L.; RODGERS, R.J.; CANTO DE SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavi Brain Res.* 2008;187(1):72-9.

OLIVEIRA, L.C.; BROIZ, .C.; DE MACEDO, C.E.; LANDEIRA-FERNANDEZ,J.; BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacology* 2007;191(2):253-62.

ÖGREN, S.O.; ERIKSSON, T.M.; ELVANDER-TOTTIE, E.; D'ADDARIO,C.; EKSTRÖM,J.C.; SVENNINGSSON,P.; MEISTER,B.; KEHR,J.; STIEDL,O. The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research* in press 2008.

PAXINOS G, & WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. (4th ed.). New York: Academic Press, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985; 14,149-167.

PHILLIPS, R.G. & LEDOUX,J.E. Differential contribution of amygdale and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosc.*1992;106(2):274-85.

POBBE, R.L.H.& ZANGROSSI, H.JR. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacol.*2005, 183:314-321

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. *Science* 1969; 161:444-445.

ROBINSON, R.T. ; DRAFTS, B.C.; FISHER, J.L. Fluoxetine increases GABA(A) receptor activity through modulatory site. *Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;304(3):978-84.

RODGERS, R.J. & COLE, F.C. THE elevated plus-maze:Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (eds). *Ethology and Pshychopharm.* New York: Wily, 1994; p.9-44.

RODGERS, R.J. & DAVIS, A. Anxiety, defense and elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21(6):801-10.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; COLE., J.C.; DEWA, C.V.; KIDD, G.R.; KIMPSON, P.H. Plus-maze retest profile: importance on initiale stages of trial 1 and response to

post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54:41-50.

ROESLER, M.R.M.; DE-PARIS, F.; QUEVEDO, J.; WALZ, R.; BIANCHIN, M. Infusion of AP5 into the basolateral amygdale impair the formation, but not expression, of setp-down inhibitory avoidance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33:829-834.

ROESLER, R.; REOLON, G.K.; LUFT, T.; MARTINS., M.R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M.R.M.; QUEVEDO, J. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochemical Research* 2005; 30, 1407-1411.

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M.R.M.; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPEZINSKI, F.; FERREIRA, M.B.C. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research* 2003; 975, 207-213.

ROSSETI, Z.L. & CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 283:177-183.

SCHREIBER, R. & DE VRY, J. 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of actions? *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Pshychyat.* 1993;17:87-104.

SCHMITT ML, COELHO W, LOPES-DE-SOUZA AS, GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci Lett*, 1995; 189: 93-6.

SENA, L.M. ; BUENO, C.; POBBE, R.L.; ANDRADE, T.G., ZANGROSSI,H.JR.; VIANA, M,B. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalizad anxiety and panic dfensive responses in rats. *Behav. Brain Res.* 2003; 142(1-2):125-33.

SHAIKH MB, DE LANEROLLE NC, SIEGEL A. Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2/1C} receptors in the midbrain periaqueductal gray differentially modulate defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat. *Brain Res*, 1997;765: 198-207.

SILVEIRA MC, GRAEFF FG. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid in the medial hypothalamus of the rat. *Braz J Med Biol Res*, 1988;21: 569-71.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDEMAN,R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology.* 1986; 90(2):166-169.

STUTZMANN, G.E. & LEDOUX, J. E. GABAergic antagonist block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: A mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19:1-4.

TEIXEIRA, K. V. & CAROBREZ, A. P. Effects of glycine or \pm -3-Amino-1-Hydroxy-2-Pyrrolidone Microinjections Along the Rostrocaudal Axis of the Dorsal Periaqueductal Gray Matter on Rats' Performance in the Elevated Plus-Maze Task. *Behavioral Neurosci.* 1999, 113 (1):196-203.

TRULLAS, R.; JACKSON, B.; SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at atychnine insensitive glycine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989; 34:313-316.

VIANA MB, GRAEFF FG, LÖSCHMANN PA. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997;58: 167-72.

VIANA, D.M.L., & BRANDÃO, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003, 36:557-566

WALKER, D.L. & DAVIS, M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footstock training. *Behavioral Neuroscience* 1997; 111(4): 692-702.

WALKER, P. & CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and post stress recovery. *Neuroscience*, 2003;116(3):897-912.

YUEN, E.Y.; JIANG, Q.; CHEN, P.; GU, Z.; FENG, J.; YAN, Z. Serotonin 5-HT_{1A} receptor regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25 (23): 5488-5501.

ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25:637-645.

ZANGROSSI, JR.H.; VIANA, M.B.; GRAEF, F.G. Anxiolytic of intra-amygdala injection of midazolan and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *European J of Pharmacology*. 1999;369:267-270.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H.JR. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur. J Pharmacol*. 2003;473(2-3):153-161.

ZHAO, M.G.; TOYODA, H.;LEE,Y.S.; WU,L.J.; KO, S.W.; ZHANG, X.H.; JIA, Y.; SHUM, F.; XU, H.; LI, B.M.; KAANG, B.K.; ZHUO,M. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 2005; 47(6):859-72.

VACCARINO, A.L.; CLEMOMONS, H.R.; MADER, G.R. JR.; MAGNUSSON, J.E. A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in rat. *Neurosc. Lett*. 1997; 236(2):117-9.

7 APÊNDICE

Tabela 1. Efeito da injeção pré-teste do agonista NMDA (25 e 100 pmol) intra SCPd sobre os parâmetros % de tempo e % de entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE. Os dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Dunnett * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Parâmetros avaliados no teste do LCE				
Infusão Pré-teste	% EBA	% TBA	AR	EBF
Veiculo/Veiculo	40,1 \pm 3,6	26,0 \pm 3,8	3,2 \pm 0,4	9,4 \pm 0,6
Veiculo/NMDA25	22,3 \pm 4,8*	6,7 \pm 0,5*	4,1 \pm 0,4	6,6 \pm 0,5*
Veiculo/NMDA100	45,3 \pm 8,2	7,2 \pm 1,0	5,0 \pm 0,9	7,2 \pm 1,0*

Tabela 2. Efeito da injeção pré-teste do agonsita 5-HT_{1A} DPAT (2 e 8 nmol) e do antagonista 5-HT_{1A} WAY (2 e 5 nmol) intra SCPd sobre os parâmetros % de tempo e % de entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE. Os dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste Dunnett * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Parâmetros avaliados no teste do LCE				
Infusão Pré-teste	% EBA	% TBA	AR	EBF
Veiculo/Veiculo	40,1 \pm 3,6	26,0 \pm 3,8	3,2 \pm 0,4	9,4 \pm 0,6
DP2/Veiculo	39,8 \pm 5,0	16,3 \pm 2,9	2,8 \pm 0,3	7,3 \pm 0,8
DP8/Veiculo	32,0 \pm 5,1	16,7 \pm 3,4	5,2 \pm 0,8*	8,7 \pm 1,0
WAY2/Veiculo	29,1 \pm 7,4	16,6 \pm 5,7	3,6 \pm 1,0	9,7 \pm 0,6
WAY5/Veiculo	38,6 \pm 4,3	24,7 \pm 3,4	2,6 \pm 0,5	10,3 \pm 1,0

Tabela 3. Efeito da infusão pre-teste de Veículo/NMDA 100 pmol, DPAT na dose de 2 e 8 nmol/Veículo, DPAT 2 nmol/NMDA 100 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Duncan's * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Parâmetros avaliados no teste do LCE				
Infusão Pré-teste	% EBA	% TBA	AR	EBF
Veículo/Veículo	40,1 \pm 3,6	26,0 \pm 3,8	3,2 \pm 0,4	9,4 \pm 0,6
Veículo/NMDA100	45,3 \pm 8,2	24,5 \pm 1,0	5,0 \pm 0,9	7,2 \pm 1,0*
DP2/Veículo	39,8 \pm 5,0	16,3 \pm 2,9	2,8 \pm 0,3	7,3 \pm 0,8
DP8/Veículo	32,0 \pm 5,1	16,7 \pm 3,4	5,2 \pm 0,8*	8,7 \pm 1,0
DP2/NMDA100	26,1 \pm 6,5	10,0 \pm 3,8*	3,2 \pm 0,0	5,1 \pm 0,6*
DP8/NMDA100	36,5 \pm 8,9	12,12,2*	3,20,4	9,8 \pm 1,3

Tabela 4. Efeito da infusão pre-teste de Veículo/NMDA 25 pmol, WAY 2 e 5 nmol/Veículo, WAY 2 nmol/NMDA 25 pmol e WAY 5 nmol/NMDA 25 pmol na SCPd sobre os parâmetros % tempo e entradas nos braços abertos, frequência do comportamento de avaliação de risco e frequência de entradas nos braços fechados de ratos submetidos por 5 minutos ao LCE (n=6 13 por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ANOVA seguida pelo teste Duncan's * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Parâmetros avaliados no teste do LCE				
Infusão Pré-teste	% EBA	% TBA	AR	EBF
Veículo/Veículo	40,1 \pm 3,6	26,0 \pm 3,8	3,2 \pm 0,4	9,4 \pm 0,6
Veículo/NMDA25	22,3 \pm 4,8*	6,7 \pm 0,5*	4,1 \pm 0,4	6,6 \pm 0,5*
WAY2/Veículo	29,1 \pm 7,4	16,6 \pm 5,7	3,6 \pm 1,0	9,7 \pm 0,6
WAY5/Veículo	38,6 \pm 4,3	24,7 \pm 3,4	2,6 \pm 0,5	10,3 \pm 1,0
WAY2/NMDA25	19,3 \pm 5,4*	6,9 \pm 3,9*	5,1 \pm 0,8	6,0 \pm 0,8*
WAY5/NMDA25	35,3 \pm 6,6	16,6 \pm 4,4	3,8 \pm 0,6	6,6 \pm 0,7*

Tabela 5. Efeito da infusão de NMDA(25 e 100 pmol) na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma (n= 10-15 por grupo). Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o treino e teste (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste post-hoc Dunnett.

	INFUSÃO PRÉ-TREINO		
MEDIDA/SESSÃO	V/V	V/NMDA25	V/NMDA100
Latência Treino	- 6+9		
Δ Latência Teste	100,8 \pm 16	31,88 \pm 6,5	14,25 \pm 8,8

Tabela 6. Efeito da infusão de DPAT (2 e 8 nmol) e de WAY (2 e 5 nmol) na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o treino e teste (Δ latência). ANOVA seguida pelo teste post-hoc Dunnett.

	INFUSÃO PRÉ-TREINO				
MEDIDA/SESSÃO	V/V	DPAT 2/V	DPAT 8/V	WAY2/V	WAY5/V
Latência Treino	- 6+9				
Δ Latência Teste	100,8 \pm 16	85,8 \pm 22,4	90,8 \pm 21,3	113,2 \pm 23,1	102,8 \pm 22,4

Tabela 7. Efeito da infusão de veículo/NMDA (25 e 100 pmol), DPAT 8 nmol/NMDA 25 pmol e DPAT 8 nmol/NMDA 100 pmol na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão treino estão representados como o intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante a sessão teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Duncan * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

	INFUSÃO PRÉ-TREINO					
MEDIDA/SESSÃO	V/V	V/NMDA25	V/NMDA100	DPAT8/V	DPAT8/NMDA25	DPAT8/NM100
Latência Treino	- 6+9					
Δ Latência Teste	100,8 \pm 1	31,8 \pm 6,5	14,2 \pm 8,8	90,8 \pm 21,4	122,4 \pm 24,7	90,4 \pm 18,4

Tabela 8. Efeito da infusão de NMDA(25 pmol) e DPAT8/NMDA25 pmol na SCPd, imediatamente após o treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão de treino estão representados como intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante o teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença do tempo de latência de descida da plataforma entre o treino e teste (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Duncan * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

	INFUSÃO PÓS-TREINO		
MEDIDA/SESSÃO	V/V	V/NMDA25	DP8/NMDA25
Latência Treino	- 3+7		
Δ Latência Teste	84,7 \pm 18,9	8,3 \pm 1,8	18,2 \pm 5,3

Tabela 9. Efeito da infusão de veículo/NMDA 25 pmol, veículo/WAY (2 e 5 nmol), WAY 2/NMDA25 e WAY 5/NMDA25 na SCPd, antes do treino de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma. Os dados obtidos durante a sessão treino estão representados como o intervalo de confiança (95%) em torno da média das latências obtidas nesta sessão. Os dados obtidos durante a sessão teste estão representados como média \pm EPM e compreendem a diferença de tempo de latência de descida da plataforma entre teste e treino (Δ latência). A ANOVA seguida pelo teste post-hoc Duncan * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

	INFUSÃO PRÉ-TREINO					
MEDIDA/SESSÃO	V/V	V/NMDA25	WAY2/V	WAY5/V	WAY2/NMDA25	WAY5/NMDA25
Latência Treino	- 6+9					
Δ Latência Teste	100,8 \pm 1	31,8 \pm 6,5	113,2 \pm 23,1	102,8 \pm 22,4	14,2 \pm 8,2	42,4 \pm 11,3